

SHIRLEY MOTTA DE SOUZA

**DESEMPENHO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS
ALIMENTADAS COM ÓLEO DE GIRASSOL EM DIETAS À BASE DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S719d
2011

Souza, Shirley Motta de, 1980-

Desempenho e perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar / Shirley Motta de Souza. – Viçosa, MG, 2011.

ix, 87f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Alimentação e rações. 2. Plantas forrageiras.
3. Lipídeos. 4. Óleos vegetais. 5. Bovino - Nutrição.
6. *Saccharum officinarum*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 636.20852

SHIRLEY MOTTA DE SOUZA

**DESEMPENHO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS
ALIMENTADAS COM ÓLEO DE GIRASSOL EM DIETAS À BASE DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 30 de maio de 2011

Dr. Fernando César Ferraz Lopes
(Coorientador)

Profa. Rilene Ferreira Diniz Valadares
(Coorientador)

Prof. Francisco Palma Rennó

Profa. Luciana Navajas Rennó

Prof. Sebastião de Campos Valadares Filho
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida e pela forte presença nos momentos difíceis, pelas bênçãos e por nunca me deixar desistir diante dos obstáculos da vida.

Agradeço à minha família que soube tolerar minha ausência e por sempre me apoiar incondicionalmente. A vocês, minha eterna gratidão pelos valores que me ensinaram e, por sempre terem me incentivado a buscar uma boa formação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pelo acolhimento desde a graduação e pelos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida e pelo apoio financeiro ao projeto.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a execução deste projeto.

A todos da Embrapa Gado de Leite (CNPGL) muito obrigada por me acolher tão bem durante essa etapa do doutorado e pela experiência enriquecedora, em especial ao Dr. Duarte Vilela, Dr. Rui da Silva Verneque e Dr. Henrique Bruschi (*in memoriam*) pelo apoio durante a coleta de dados para a tese no campo experimental em Coronel Pacheco.

Ao Dr. Fernando César Ferraz Lopes pela orientação e pelo profissionalismo. É impossível expressar aqui a minha gratidão pela oportunidade de trabalhar com você! Obrigada pela sincera amizade e, principalmente, pela confiança.

À profa. Maria Ignez pela idealização do projeto, pelos ensinamentos e excelentes momentos juntos.

À profa. Luciana e família pela amizade e gratidão de convívio junto a vocês.

Ao prof. Sebastião pela orientação, disponibilidade e atenção.

À profa. Rilene pelas valiosas contribuições para realização desse trabalho.

Ao prof. Francisco Rennó que prontamente aceitou participar da banca e pelas críticas e sugestões enriquecedoras.

A todos os funcionários do Campo Experimental de Coronel Pacheco, em especial aos funcionários da Genizinha, pelo importante apoio durante a realização dos experimentos e pelos bons momentos compartilhados.

Ao Dr. Antonio Cândido (Tunico) pela cirurgia de fístulas dos animais e pela amizade. Ao “Seu Klinger” pela disponibilidade em sempre ajudar. Ao Armando pelo apoio durante a realização do experimento.

À família Biogás, em especial à equipe 3M: Meire, Moreira e Mengo pelo auxílio incondicional, mas certamente o agradecimento, e pela amizade e carinho. À Carol Alvim pela amizade e boas risadas durante as madrugadas e finais de semana de coleta. Ao Diego Fernandes por compartilhar dos momentos de absoluto cansaço com alegria e companheirismo.

Às meninas do alojamento que não irei citar nomes para não cometer o equívoco de me esquecer de alguém – muito obrigada a todas pela convivência. À Rebeca pela sincera amizade e apoio espiritual. Com você aprendi muito, obrigada minha querida amiga.

Aos residentes do campo experimental, principalmente aos “Trapalhões”: Didi (Bruno), Dedé (Alberto), Mussum (Carlos) e Zacarias (Ismael). Não tem como me esquecer de vocês. Obrigada pelas risadas e ajuda durante o experimento. Saudades dos bons momentos. E também não poderia me esquecer do Neildo (Neizinho) meu braço direito, obrigada por tudo. Estar com vocês foi um enorme prazer e mesmo a vida levando cada um a traçar caminhos diferentes, espero que um dia os reencontre. À Angélica (Angelikete) pelo companheirismo, colaboração e pela amizade.

Ao pesquisador Marco Antonio Sundfeld da Gama pelos esclarecimentos e contribuição com o projeto.

Aos funcionários da sede: Mário, Luiz, Michele, Ricardo e Cecília pela contribuição nas análises laboratoriais. Em especial à Nilva, não só pelas boas risadas e a cervejinha no final do expediente, mas, pela amizade e pelo carinho.

Ao pesquisador Dr. Leônidas que tão gentilmente disponibilizou laboratório para execução das análises que necessitávamos para finalização desse trabalho.

Ao Hernani pela contribuição fundamental nas análises de cromatografia. E ao Ernando, pelas sugestões imprescindíveis durante as análises e pela valiosa oportunidade de treinamento e troca de experiências, pela receptividade e paciência com que me recebeu.

Ao Victor (Victor Hugo) não apenas pela ajuda nas análises laboratoriais, mas por fazer minha estadia em Juiz de Fora mais agradável, pela paciência e pelos momentos de descontração no Bar do Bigode. À Carol Banni, amiga querida e excelente profissional, torço muito por você.

E todos meus queridos amigos de Viçosa que, de certa forma, sempre estiveram presentes: Nae, Toquinho, Simone. Não me esqueço o dia em que foram me deixar em

Coronel Pacheco. E à Stefanie, minha “irmã-científica” e consultora de todas as horas e meu querido amigo André Soares, sempre um exemplo para mim.

Um agradecimento especial ao Sr. Jojo pela disponibilidade de me auxiliar na primeira coleta de omaso, assim como toda a sua família pelo convívio. E também não poderia deixar de agradecer ao Dr. Antônio Carlos por todas as refeições diárias.

Assim como os novos amigos que fiz em Juiz de Fora, muito obrigada por cada momento compartilhado. Em especial ao meu querido amigo Miguel Ângelo pelas boas risadas.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

CONTEÚDO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
Introdução Geral	01
Literatura Citada	06
Desempenho produtivo e eficiência de utilização de nutrientes em vacas leiteiras alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar.....	08
Resumo	09
Abstract.....	09
Introdução	09
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	19
Conclusão	34
Literatura Citada	35
Metabolismo de lipídeos no rúmen de vacas leiteiras alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar	41
Resumo	41
Abstract.....	42
Introdução	43
Material e Métodos	44
Resultados e Discussão	54
Conclusão	77
Literatura Citada	78

RESUMO

SOUZA, Shirley Motta de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Desempenho e perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar.** Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho. Coorientadores: Fernando César Ferraz Lopes e Rilene Ferreira Diniz Valadares.

O objetivo desse trabalho foi avaliar dietas contendo cana-de-açúcar e óleo de girassol na alimentação de vacas leiteiras. O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Leite. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas, com 14,5% de proteína bruta, na base da matéria seca (MS). Foram utilizadas quatro dietas (tratamentos) constituídas de cana-de-açúcar e quatro níveis de óleo de girassol (OG): 0, 1,5; 3,0 e 4,5% na base da MS, com relação volumoso:concentrado de 60:40. No **experimento I** foram utilizadas 12 vacas Holandês x Gir, multíparas, com produção média de 17 ± 5 kg de leite/dia, peso corporal médio de 500 ± 51 kg, distribuídas em três quadrados latinos 4 x 4, contemporâneos e balanceados para efeito residual. Cada um dos quatro períodos experimentais teve duração de 16 dias, sendo os dez primeiros de adaptação e os demais para as coletas de dados. As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (6:00 h e 14:00 h), e amostras de leite foram obtidas diariamente do 11° ao 16° dia para determinação dos teores de lactose, gordura, nitrogênio total, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, perfil de ácidos graxos e concentrações de ureia e alantoína. A produção de matéria seca fecal foi obtida com a fibra em detergente neutro indigestível, sendo as amostras coletadas durante seis dias. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos níveis de inclusão de OG nas dietas sobre o consumo de matéria seca, a produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura, e os teores de proteína e lactose do leite. Houve efeito linear decrescente dos níveis de OG sobre os teores de gordura e de sólidos no leite ($P < 0,05$) e sobre a produção de gordura ($P < 0,05$). Houve efeito linear decrescente dos níveis de OG sobre a produção de proteína microbiana. Houve aumento ($P < 0,05$) da concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados, colesterol total e triglicerídeos com o aumento do nível de OG. Foi observada redução ($P < 0,05$) na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média, e concomitantemente houve aumento ($P < 0,05$) na concentração do CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11, assim como na concentração de ácidos graxos insaturados na gordura do leite. No **experimento II** foram utilizadas quatro

vacas Holandês x Gir, múltíparas, fistuladas no rúmen, com produção média de 15 ± 5 kg de leite/dia e peso corporal médio de 500 ± 39 kg, distribuídas em quadrado latino 4 x 4, balanceado para efeito residual. Cada um dos quatro períodos experimentais teve duração de 19 dias, sendo os dez primeiros de adaptação e os demais para as coletas de dados. As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (6:00 h e 14:00 h), e amostras de leite foram obtidas diariamente do 11º ao 19º dia para determinação dos teores de lactose, gordura, nitrogênio total, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, perfil de ácidos graxos e concentrações de ureia e alantoína. A produção de matéria seca fecal foi estimada com a fibra em detergente neutro indigestível, sendo as amostras coletadas durante seis dias. Não houve efeito ($P>0,05$) dos diferentes níveis de OG nas dietas sobre o consumo de matéria seca, produção de leite ou teores de proteína e lactose do leite. Porém, houve efeito linear decrescente sobre os teores de gordura e de sólidos no leite ($P<0,05$) e sobre a produção de gordura ($P<0,05$). Houve redução ($P<0,05$) na produção de proteína microbiana, assim como aumento ($P<0,05$) na concentração plasmática de colesterol total e HDL. Houve redução ($P<0,05$) na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média e aumento ($P<0,05$) na concentração do CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11, assim com os ácidos graxos insaturados na gordura do leite. A suplementação com OG não alterou o fluxo ruminal de MS, MO, PB e FDNcp. As vacas alimentadas com óleo de girassol apresentaram maiores concentrações de C18:1 *trans*-4, C18:1 *trans* 6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12, C18:1 *trans*-12 e *trans*-13, assim como maiores teores de C18:1 *cis*-13 e C18:1 *trans*-16 no canal do omaso. Não houve efeito ($P>0,05$) dos níveis de inclusão de OG nas dietas sobre os parâmetros de degradação da matéria seca e da fibra em detergente neutro, assim como para pH, concentração de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis no rúmen. Conclui-se que a suplementação de óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar diminui a concentração de ácidos graxos de cadeia média frequentemente relacionados a doenças cardiovasculares, e proporciona aumento no teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11, tornando o leite produzido mais propício ao consumo humano.

ABSTRACT

SOUZA, Shirley Motta de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2011. **Performance and milk fatty acid composition of dairy cows fed sugar cane-based diets containing increasing levels of sunflower oil.** Adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho. Co-Advisers: Fernando César Ferraz Lopes and Rilene Ferreira Diniz Valadares.

Two experiments were carried out at Embrapa Dairy Cattle in order to evaluate the effects of sugar cane-based diets containing different levels of sunflower oil (0, 1.5, 3.0 and 4.5% of diet DM) on performance and milk fatty acid composition of dairy cows. In Experiment 1, twelve multiparous Holstein x Gir cows in milk and average milk production of 17 ± 5 kg/d) received the four dietary treatments (levels of sunflower oil inclusion, % of diet DM) in a triplicate 4 x 4 Latin Square design balanced for residual effect. Each experimental period lasted 16 days, being 10 d for adaptation and the last 6 d for data collection. During the collection period, milk samples were obtained daily from morning and afternoon milking and analyzed for major components (fat, protein and lactose) as well as urea and allantoin contents. Additionally, blood and milk samples were collected on the last day of each experimental period, frozen at -20°C and analyzed for plasma metabolites and fatty acid profile, respectively. The production of faecal dry matter was estimated from samples collected during six consecutive days using indigestible NDF as an internal indicator. There was no effect of dietary treatments on DM intake, milk production (corrected or not for 3.5% fat), milk protein and milk lactose content. However, milk fat content and yield as well as total solids content and microbial protein production were linearly reduced as the level of sunflower oil in the diet increased from 0 to 4.5%. On the other hand, blood concentrations of NEFA, total cholesterol and triglycerides were positively associated with the level of sunflower oil in the diet. The concentrations of short and medium chain fatty acids in milk fat were linearly reduced as the level of sunflower oil increased, whereas total unsaturated fatty acids and CLA in milk fat were increased. In Experiment 2, four multiparous Holstein x Gir cows with cannulas in the rumen were used in a balanced 4 x 4 Latin Square design composed of 19-day experimental periods (10 d for adaptation and the last 9 d for data collection). Milk and blood samples were collected during the last 9 days of each experimental period as described in the Experiment 1, and then analyzed for the same components. The production of faecal dry matter was also

estimated from samples collected during six consecutive days using indigestible NDF as an internal indicator. Dry matter intake, milk production, milk composition (including milk fatty acid profile) and production of microbial protein were affected the same way as observed in the Experiment 1. Sunflower oil did not alter the flow of DM, OM, CP and NDFap. The cows fed sunflower oil had higher levels of C18:1 *trans*-4, C18:1 *trans* 6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12, C18:1 *trans*-12 and *trans*-13, as well as higher levels of C18:1 *cis*-13 and C18:1 *trans*-16 in the canal of the omasum. Concentrations of total cholesterol and HDL in blood increased as the level of sunflower oil in the diet increased from 0 to 4.5%. Dry matter and NDF digestibility, pH and concentrations of NH₃ and VFA in the rumen were unaffected by dietary treatments. It can be concluded that the inclusion of sunflower oil into sugar cane-based diets reduces the concentration of hypercholesterolemic medium chain saturated fatty acids and increases the concentration of health-promoting polyunsaturated fatty acids such as *cis*-9 *trans*-11 CLA in milk fat from Holstein x Gir dairy cows, which could be beneficial to human health. However, the reduction in milk fat content observed in cows fed diets containing sunflower oil would be disadvantageous in payment systems based on milk solids content. Therefore, this adverse response should be weighed against the potential benefits of producing milk with enhanced nutraceutical properties.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de fontes ricas em lipídeos na alimentação dos ruminantes tem sido foco de diversas pesquisas nos últimos anos. A manipulação da dieta com intuito de alterar a produção e a composição do leite busca produzir um alimento de melhor qualidade e, concomitantemente, elevar a quantidade de seus componentes, aumentando o retorno econômico para o produtor. Todos os componentes do leite são sujeitos à manipulação. Entretanto, o potencial dessa mudança varia, dependendo do componente. Em geral, o teor de gordura e sua composição em ácidos graxos são os mais sujeitos a mudanças (Oliveira & Cáceres, 2005).

As exigências do consumidor por produtos mais saudáveis, associadas às novas descobertas científicas sobre os efeitos na saúde humana têm motivado a busca de alimentos nutracêuticos. Alimento funcional ou nutracêutico é aquele que além de nutrir, melhora o funcionamento e ajuda a prevenir ou mesmo curar disfunções ou doenças (Buttriss, 2000). No Brasil, a definição desta classe de alimentos foi feita pela portaria nº 398 de 30/04/1999 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável pela regulamentação destes alimentos e, que define alimento funcional como sendo todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Além da contribuição benéfica para a saúde humana, o desenvolvimento destes produtos pode ser uma importante fonte de agregação de valor ao produto primário. O Instituto Euromonitor estimou que os alimentos funcionais movimentam em todo o mundo cerca de US\$ 70 bilhões/ano. No Brasil, dados da Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais apontam faturamento do setor de R\$ 350 milhões por semestre. Esse mercado vem crescendo ao ritmo de 10% ao

ano. Ou seja, três vezes mais que o de alimentos tradicionais. A previsão é que, em dez anos, os funcionais detenham 40% do mercado de alimentos.

A gordura do leite de ruminantes contém diversos componentes capazes de promover efeitos benéficos à saúde humana, como o ácido butírico, que tem sido sugerido como potente inibidor da proliferação de células cancerígenas e indutor da diferenciação e apoptose de diferentes linhagens destas células, além dos ácidos graxos de cadeia ramificada, o CLA *cis-9 trans-11* e o seu precursor, o ácido vaccênico (C18:1 *trans-11*).

Em particular, grande atenção tem sido direcionada para os ácidos linoleicos conjugados (CLA), desde a descoberta de suas propriedades anticarcinogênicas em estudos realizados há mais de duas décadas. Outros benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao CLA, como por exemplo: redução na deposição de gordura corporal, alteração na partição de nutrientes, efeitos antidiabetogênicos, redução no desenvolvimento de aterosclerose, aumento na mineração óssea e modulação do sistema imune (McGuire, 1999). O principal isômero conjugado do ácido linoleico, naturalmente encontrado na gordura do leite, é o ácido octadecadienoico *cis-9, trans-11*, sendo ainda considerado como o mais biologicamente ativo, pois é preferencialmente incorporado nos fosfolípidos de membranas celulares (Bessa et al., 2000; Roche et al., 2001). Além disso, ele representa de 75 a 90% do total de CLA presente na gordura do leite de ruminantes (Kramer et al., 1998), seguido pelo CLA *trans-7 cis-9*, compreendendo 3 a 16% do CLA total (Bauman et al., 2003).

O CLA *trans-10 cis-12* ocorre em baixíssima concentração na gordura do leite, embora sua concentração possa ser significativamente aumentada quando dietas com baixo teor de fibra e elevada concentração de lipídeos poli-insaturados são fornecidas às vacas, resultando em acentuada queda do teor de gordura do leite (Piperova et al.,

2000), sendo formado no rúmen pela incompleta biohidrogenação de ácidos graxos insaturados provenientes da dieta, por dessaturação na glândula mamária e em outros tecidos.

Estudos têm mostrado que por meio da manipulação da dieta dos ruminantes, pode-se modular o teor de CLA na gordura do leite, e neste caso, os dois isômeros mais estudados são o CLA *cis*-9, *trans*-11 e o CLA *trans*-10, *cis*-12. Porém, esta alteração no perfil de ácidos graxos produzidos no rúmen e secretados no leite pode, por sua vez, resultar em redução do teor de gordura do leite, o que pode gerar prejuízo ao produtor no caso de pagamento do leite por qualidade (Gama, 2010).

A cana-de-açúcar se destaca entre as gramíneas tropicais pelo seu potencial de produção de matéria seca por unidade de área, pelo baixo custo por unidade de matéria seca produzida, além de coincidir a sua maturidade com o período de escassez de pasto, o que a torna importante fonte de volumoso (Amaral Neto et al., 2000). Existem limitações quanto ao consumo dessa forrageira por bovinos, particularmente os de raças leiteiras, decorrentes, principalmente, da baixa digestibilidade da fibra que pode comprometer o consumo voluntário. Além disso, entre outras limitações, encontram-se o baixo teor de proteína, a elevada concentração de carboidratos solúveis, o pequeno aporte pós-ruminal de aminoácidos e de glicose, o aumento na quantidade de protozoários no rúmen e o desbalanço de minerais (Preston & Leng, 1978; Preston, 1982).

O girassol é uma cultura que vem se despontando no Brasil, ocupando novas áreas a cada ano e, hoje, destaca-se como a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo. A produção nacional gira em torno de 102,4 mil toneladas, ou seja, 27,0% superior à safra de 2010, o que representa 21,8 mil toneladas a mais (CONAB, 2011). Essa expansão do girassol se dá pela fácil adaptação às

condições pouco favoráveis de solo e clima, podendo ser considerada uma cultura de cultivo rústico, não requerendo manejo especializado. As condições de solo adequadas para sua germinação não diferem das exigidas para soja e milho, sendo o girassol apenas mais sensível à acidez do solo. Mundialmente cultivado visando à obtenção de seu óleo, rico em gorduras poli-insaturadas (5,8 g/10 mL de óleo) que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares, o girassol possui também outras qualidades como o seu farelo rico em proteína, e a viscosidade do biodiesel dele extraído (Rossi, 1998).

O óleo de girassol corresponde a 13% de todo óleo vegetal comestível produzido no mundo, além de ser utilizado como planta ornamental, medicinal, fonte de potássio, para produção de mel, fabricação de borracha, consumo humano e animal e, mais recentemente, como fonte energética na forma de biocombustível. Cerca de 91% da produção de girassol é destinada ao processamento industrial, resultando em cerca de 12 milhões de toneladas de farelo e 10 milhões de toneladas de óleo. Para cada tonelada de grãos de girassol esmagados são produzidos 400 kg de óleo, 250 kg de casca e 350 kg de torta com 45 a 50% de proteína (Ribeiro, 1998).

Na maioria dos trabalhos em que foi demonstrado o potencial da suplementação de dietas de vacas leiteiras com fontes lipídicas de origem vegetal ricas em ácidos linoleico e/ou α -linolênico em alterar positivamente o perfil de ácidos graxos da gordura do leite (Collomb et al., 2006; Huang et al., 2008), foram utilizadas espécies forrageiras de ciclo fotossintético C3, fornecidas, principalmente, sob a forma de fenos e silagens. Nos processos de fenação e ensilagem podem ocorrer perdas oxidativas de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente α -linolênico (Dewhurst et al., 2006), que é o principal substrato lipídico para formação do ácido vaccênico, via processo de biohidrogenação no rúmen, e subsequentemente pode ser dessaturado para formação do

ácido rumênico na glândula mamária (Bargo et al., 2006; Elgersma et al., 2006). Por esta razão, o leite de vacas alimentadas com forrageiras fornecidas frescas apresenta potencialmente maior relação de ácidos graxos insaturados:saturados, maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados e de CLA que o obtido do leite de vacas recebendo dietas baseadas em forragens conservadas (Elgersma et al., 2006; Gama et al., 2008).

A associação dietética de óleos vegetais com forrageiras tropicais fornecidas *in natura* para vacas pode apresentar grande potencial para alterar positivamente a composição da gordura do leite em termos de nutrição e saúde humana. Neste sentido, as pesquisas sobre CLA têm sido desenvolvidas, quase que exclusivamente, em regiões de clima temperado. Assim, a geração de conhecimento científico sobre o potencial de produção de forrageiras tropicais torna-se necessário, sendo, portanto o objetivo desse trabalho.

LITERATURA CITADA

- AMARAL NETO, J.; OLIVEIRA, M.D.S.; LANÇANOVA, J.A.C. et al. Composição químico-bromatológica da silagem de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. (CD-ROM).
- BARGO, F.; DELAHOY, J.E.; SCHROEDER, G.F. et al. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.226–240, 2006.
- BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 23, p. 203–27, 2003.
- BESSA, R. J. B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, R. M. R et al. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 201-211, 2000.
- BUTTRISS, J. Is Britain ready for FOSHU? **Nutrition Bulletin**, v.25, p.159-161,2000.
- COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R. et al. Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v.16, p.1347-1361, 2006.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Série histórica: área, produção e produtividade**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/> Acesso em: 17 de março 2011.
- DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J; LEE, M.R.F. et al. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.168–206, 2006.
- ELGERSMA, A.; TAMMINGA, S.; ELLEN, G. Modifying milk composition through forage. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.207-225, 2006.
- GAMA, M.A.S.; LOPES, F.C.F.; RIGUEIRA, J.C.S. et al. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa de manteigas oriundas de vacas recebendo dietas com óleo de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 21., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: sBCTA/UFMG, 2008.
- GAMA, M.A.S.; **Produção de leite com alto teor de ácido linoléico conjugado (CLA)**. In: 11º Congresso Pan-Americano do Leite, Belo Horizonte. 22p. 2010.
- HUANG, Y.; SCHHONMAKER, J.P.; BRADFORD, B.J. et al. Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.260-270, 2008.
- KRAMER, J. K. G.; PARODI, P. W.; JENSEN, R. G. et al. Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. **Lipids**, Champaign, v. 33, n. 8, p. 835, 1998.
- MCGUIRE, M. K., M. A. MCGUIRE, K. RITZENTHALER, and T. D. SHULTZ.1999. Dietary sources and intakes of conjugated linoleic acid intake in humans. In: M.P.Yurawecz, M. M. Mossoba, M. W.Pariza, and G. J. Nelson (ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. vol. 1. pp 369-377. AOCS Press, Champaign, IL.
- OLIVEIRA, M.D.S.; CÁCERES, D.R. **Girassol na alimentação de bovinos**.Jaboticabal: FUNEP, 2005. 20 p.
- PIPEROVA, L. S., B. B. TETER, I. BRUCKENTAL, J. SAMPUGNA, S. E. MILLS, M. P. YURAWECZ, J. FRITSCHKE, K. KU, and R. A. ERDMAN. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered

- in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. **Journal of Nutrition**. 130:2568–2574.
- PRESTON, T.R. Nutritional limitations associated with the feeding of tropical forages. **Journal of Animal Science**, v.54, n.4, p.877-883, 1982.
- PRESTON, T.R.; LENG, R.A. La caña de azúcar como alimento para los bovinos. **Revista Mundial de Zootecnia**, n.27, p.7-12, 1978.
- RIBEIRO, L.R. Girassol: opção de cultivo para a produção de óleo comestível. In: SIMPÓSIO AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 1998, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: Embrapa-CNPAT, p.58-62, 1998.
- ROCHE, H. M.; NOONE, E.; NUGENT, A. et al. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 14, p. 173-187, 2001.
- ROSSI, R.O. **Girassol**. Curitiba: Tecnoagro, 1998. 333p.

Desempenho produtivo e eficiência de utilização de nutrientes em vacas leiteiras alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar

RESUMO – O objetivo desse trabalho foi avaliar dietas contendo cana-de-açúcar e óleo de girassol na alimentação de vacas leiteiras. O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas 12 vacas Holandês x Gir, multíparas, com produção média de 17 ± 5 kg de leite/dia, peso corporal médio de 500 ± 51 kg, distribuídas em três quadrados latinos 4 x 4, contemporâneos e balanceados para efeito residual. Foram utilizadas quatro dietas (tratamentos) constituídas de cana-de-açúcar e quatro níveis de óleo de girassol (OG): 0, 1,5; 3,0 e 4,5% na base da MS, com relação volumoso:concentrado de 60:40. Cada um dos quatro períodos experimentais teve duração de 16 dias, sendo os dez primeiros de adaptação e os demais para as coletas de dados. Todas as dietas foram formuladas para serem isoproteicas, com 14,5% de proteína bruta, na base da MS. As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (6:00 h e 14:00 h), e amostras de leite foram obtidas diariamente do 11º ao 16º dia para determinação dos teores de lactose, gordura, nitrogênio total, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, perfil de ácidos graxos e concentrações de ureia e alantoína. A produção de matéria seca fecal foi estimada com a fibra em detergente neutro indigestível, sendo as amostras de fezes coletadas durante seis dias. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos níveis de inclusão de OG nas dietas sobre o consumo de matéria seca, a produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura, e os teores de proteína e lactose do leite. Porém, houve efeito linear decrescente dos níveis de OG sobre os teores de gordura e de sólidos no leite ($P < 0,05$) e sobre a produção de gordura ($P < 0,05$). Houve efeito linear decrescente dos níveis de OG sobre a produção de proteína microbiana. Houve aumento ($P < 0,05$) da concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados, colesterol total e triglicerídeos com o aumento dos níveis de OG nas dietas. Houve redução ($P < 0,05$) na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média, e concomitantemente aumento na concentração do CLA, assim como na concentração de ácidos graxos insaturados na gordura do leite. Conclui-se que a suplementação de óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar diminui a concentração de ácidos graxos de cadeia média, frequentemente relacionados a doenças cardiovasculares, e proporciona aumento no teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente, o CLA, tornando o leite produzido mais propício ao consumo humano.

Palavras-chave: forrageira tropical, lipídeos, óleo vegetal, *Saccharum officinarum*

Performance, milk fatty acid profile and efficiency of nutrient utilization in dairy cows fed sugar cane-based diets containing different levels of sunflower oil

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the effects of sugar cane-based diets containing different levels of sunflower oil (SFO) on performance and efficiency of nutrient utilization of lactating dairy cows. Twelve multiparous Holstein x Gir dairy cows days in milk and average milk production of 17 ± 5 kg/d received the following dietary treatments (levels of SFO inclusion, % of diet DM) in a triplicate 4 x 4 Latin Square design: 1) Control: diet containing no SFO; 2) SFO1: diet containing 1.5% of SO; 3) SFO2: diet containing 3.0% of SFO and 4) SFO3: diet containing 4.5% of SFO. Diets were isoproteic (14.5% CP) and fed once a day as total mixed rations (TMR) composed of sugarcane and a concentrate mixture (60:40, % of diet DM). Each experimental period lasted 16 days, being the first 10 days for adaptation and the last 6 days for data collection. Milk samples were collected from morning and afternoon milking (6:00 and 14:00 h, respectively) during the last 6 days of each experimental period and analyzed for total solids, fat, protein, lactose, urea and allantoin contents. Additionally, blood and milk samples were collected on the last day of each experimental period, frozen at -20°C and analyzed for plasma metabolites and fatty acid profile, respectively. The production of faecal dry matter was estimated from samples collected during six consecutive days using indigestible NDF as an internal indicator. There was no effect of dietary treatments on DM intake, milk production, milk production corrected for 3.5% fat, milk protein and milk lactose content. However, milk fat content and yield as well as total solids content and microbial protein production were linearly reduced as the level of SFO in the diet increased from 0 to 4.5%. On the other hand, blood concentrations of NEFA, total cholesterol and triglycerides were positively associated with the level of SFO in the diet. The concentrations of short and medium chain fatty acids in milk fat were linearly reduced as the level of SFO increased, whereas total unsaturated fatty acids and CLA in milk fat were increased. It was concluded that the inclusion of sunflower oil into sugar cane-based diets reduces the concentration of hypercholesterolemic medium chain saturated fatty acids and increases the concentration of health-promoting polyunsaturated fatty acids such as cis-9 trans-11 CLA in milk fat from Holstein x Gir dairy cows, which

could be beneficial to human health. However, the potential benefits of producing milk with an improved fatty acid profile should be weighed against the detrimental effect on milk fat content observed in cows fed SFO.

Keywords: vegetable oil, lipids, *Saccharum officinarum*, tropical forage

INTRODUÇÃO

Suplementos lipídicos são incluídos na dieta de ruminantes para aumentar sua densidade energética, melhorar a utilização de nutrientes, incrementar as produções de carne e leite e possibilitar a manipulação da composição em ácidos graxos destes produtos (Palmquist et al., 1993). Um dos aspectos amplamente estudados é a composição dos ácidos graxos em produtos de origem animal, principalmente quanto ao seu enriquecimento por meio do aumento da concentração do ácido linoleico conjugado (CLA).

A cana-de-açúcar se destaca entre as gramíneas tropicais pelo seu potencial de produção de matéria seca por unidade de área, do baixo custo por unidade de matéria seca produzida, além de coincidir sua maturidade com o período de escassez de pasto, o que a torna importante fonte de volumoso (Amaral Neto et al., 2000). Existem limitações quanto ao consumo dessa forrageira por bovinos, principalmente, em decorrência da baixa digestibilidade da fibra que pode comprometer o consumo voluntário, assim como o baixo teor de proteína, o alto teor de carboidratos solúveis, o pequeno aporte pós-ruminal de aminoácidos e de glicose, o aumento na quantidade de protozoários no rúmen e o desbalanço de minerais (Preston & Leng, 1978; Preston, 1982).

O óleo de girassol corresponde a 13% de todo óleo vegetal comestível produzido no mundo, sendo que, aproximadamente, 91% da produção de girassol é destinada ao processamento industrial, resultando em cerca de 12 milhões de toneladas de farelo e 10 milhões de toneladas de óleo. Além disso, o óleo de girassol possui excelentes características nutricionais (Fernandes et al., 1998), dentre elas alta relação de ácidos graxos poli-insaturados/saturados (65,3 % e 11,6%, respectivamente), sendo o teor de poli-insaturados constituído, em sua quase totalidade, pelo ácido linoleico (65%) que por não ser sintetizado pelo organismo, é classificado como essencial, participando de funções fisiológicas do organismo (Andrade, 1994).

A cana-de-açúcar é um recurso forrageiro largamente empregado na alimentação dos rebanhos leiteiros durante a época seca, porém não existem trabalhos na literatura que determinam o potencial de utilização dessa forrageira e a associação de óleos vegetais. O óleo de girassol, rico em ácido linoleico, com cana-de-açúcar fornecida *in natura* pode alterar positivamente a composição da gordura do leite em termos de nutrição e saúde humana. Assim, objetivou-se avaliar dietas constituídas de cana-de-açúcar e diferentes teores de óleo de girassol no desempenho produtivo, na composição da gordura do leite e na eficiência de utilização de nutrientes em vacas leiteiras.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP), de propriedade da Embrapa Gado de Leite, entre julho e dezembro de 2009. O município fica localizado no município de Coronel Pacheco, na região da Zona da Mata de Minas Gerais à latitude 21° 33' 22" sul e longitude 43° 06' 15" oeste, estando à altitude de 426 m. O clima na região é do tipo Cwb, segundo o sistema Köppen, ou seja, mesotérmico com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos. A precipitação média anual é de 1.600 mm, aproximadamente, apresentando período mais seco de maio a outubro, com precipitação média de 350 mm, e período mais chuvoso, de novembro a

abril, com precipitação média de 1.250 mm. A temperatura média anual é de 22,5° C e a média dos meses mais quentes (dezembro a março) de 25° C e a média dos meses mais frios (junho a agosto) de 19,5° C. A umidade relativa média é em torno de 77%.

Foram utilizadas 12 vacas Holandês x Gir, multíparas, com produção média de 17±5 kg de leite/dia e 96±25 dias de lactação, peso corporal médio de 500±51 kg, distribuídas em três quadrados latinos 4 x 4, contemporâneos e balanceados para efeito residual de acordo com Lucas (1957), e organizados de acordo com o período de lactação. A proporção dos ingredientes no concentrado e nas dietas e a composição nutricional dos ingredientes utilizados são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1– Proporção dos ingredientes nas dietas e no concentrado de vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ingredientes	Níveis de OG (%da MS)			
	0,0	1,5	3,0	4,5
Concentrado				
Polpa cítrica	21,25	29,25	42,00	42,5
Fubá de milho	41,25	27,25	9,75	5,00
Farelo de soja	33,25	34,50	35,62	36,00
Óleo de girassol	0,00	3,75	7,50	11,25
Uréia + SA (9:1) ¹	2,63	2,63	2,63	2,63
Suplemento mineral-vitamínico ²	2,40	2,45	2,58	2,65
Dieta				
Cana-de-açúcar	60,00	60,00	60,00	60,00
Polpa cítrica	8,50	11,80	16,80	17,00
Fubá de milho	16,50	10,90	3,90	2,00
Farelo de soja	13,30	13,80	14,25	14,40
Óleo de girassol	0,00	1,50	3,00	4,50
Uréia + SA (9:1) ¹	1,05	1,05	1,05	1,05
Suplemento mineral-vitamínico ²	0,96	0,98	1,03	1,06

¹ Sulfato de amônio; ² Mistura mineral comercial

Tabela 2 – Composição nutricional dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

Itens	Farelo de Soja	Polpa Cítrica	Fubá de Milho	Cana-de-açúcar
Matéria Seca (MS, %)	88,86	88,21	87,89	28,95
Matéria Orgânica ¹	93,22	92,87	98,62	95,15
Proteína Bruta ¹	51,58	5,89	8,97	1,80
Nitrogênio não-proteico ²	19,72	19,44	19,83	74,28
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ²	4,48	43,39	9,32	24,99
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ²	2,74	12,38	3,39	13,16
Extrato etéreo ¹	1,95	2,01	3,97	1,19
Fibra em detergente ácido ¹	11,48	21,74	5,16	36,23
Fibra em detergente neutro corrigida ¹	12,18	18,33	9,79	43,79
Carboidratos não-fibrosos ¹	27,51	66,64	75,89	48,37
Lignina ¹	0,33	6,09	0,61	4,04
Ca (%)	0,23	1,48	0,02	0,13
P (%)	0,57	0,11	0,23	0,09
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	89,58	90,45	87,74	55,46

¹ - % da MS; ² - % do N total

O experimento foi constituído de quatro períodos com duração de 16 dias cada, sendo os dez primeiros para adaptação e os demais para as coletas de amostras. Os animais foram alimentados com quatro dietas à base de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivar RB 739735, com 0, 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, com base da MS. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas, com 14,5% de proteína bruta, na base da MS, de forma a atender às exigências nutricionais de uma vaca com 500 kg de peso corporal, produzindo, diariamente, 17 kg de leite e com ganho de peso diário de 0,30 kg/dia, segundo NRC (2001). A cana-de-açúcar foi fornecida *in natura*, cortada e triturada diariamente, sendo usada a relação volumoso:concentrado de 60:40. A cana-de-açúcar utilizada no experimento apresentou valor médio de 18±4 graus Brix, que segundo Brieger (1968) caracteriza o ponto em que a cana-de-açúcar atinge sua maturidade. O óleo de girassol foi misturado semanalmente com os alimentos concentrados, de forma a minimizar sua peroxidação lipídica. A composição em nutrientes das dietas experimentais é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Teores médios de nutrientes nas dietas de vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG (% da MS)			
	0,0	1,5	3,0	4,5
Matéria seca (%)	51,19	49,62	48,28	46,92
Matéria orgânica ¹	93,65	91,66	89,82	88,27
Proteína bruta ¹	12,87	12,82	12,72	12,64
Extrato etéreo ¹	1,80	3,15	4,48	5,91
Nitrogênio não-protéico ²	52,12	51,74	51,42	51,11
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ²	20,82	21,75	23,29	23,20
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ²	9,87	10,10	10,50	10,46
Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína ¹	31,07	31,18	31,47	31,34
Carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinzas e proteína ¹	49,89	46,48	43,12	40,35
Lignina ¹	3,09	3,25	3,52	3,52
Nutrientes digestíveis totais	72,67	74,87	77,17	78,05

¹ % da MS; ² - % do N total

Os animais foram alojados em baias coletivas, tipo *free stall*, providas de comedouro e bebedouro. A alimentação foi oferecida *ad libitum* na forma de mistura completa, uma vez ao dia (08:00 h), utilizando vagão misturador/distribuidor Data Ranger[®] (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA). O consumo individual de matéria seca (MS) foi determinado diariamente utilizando cochos com portões eletrônicos do tipo *calan-gates* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA). Diariamente, foram feitas pesagens das quantidades fornecidas e das sobras de cada tratamento, permitindo-se 10% de sobras em relação ao oferecido. Ao final de cada período de coleta, elaborou-se amostra composta por animal, sendo armazenada em sacos plásticos a -20°C para posterior análise bromatológica e determinação do perfil de ácidos graxos. O perfil de ácidos graxos da cana-de-açúcar e dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos nos ingredientes e nas dietas experimentais

Ácidos graxos	Óleo de girassol	Farelo de soja	Fubá de milho	Polpa cítrica	Cana-de-açúcar	Dietas (Níveis de OG)			
						0,0	1,5	3,0	4,5
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81	0,57	0,57	0,56	0,54
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,38	1,16	0,72	0,72	0,71	0,71
C14:0	0,05	0,11	0,00	0,57	0,94	0,62	0,61	0,61	0,60
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,09	0,53	0,33	0,32	0,32	0,32
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,20	0,20	0,20	0,20
C16:0	7,54	18,86	17,07	29,80	26,49	22,63	20,59	19,91	19,53
C16:1 <i>trans</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	2,41	1,45	1,64	1,45	1,45
C16:1 <i>cis</i>	0,09	0,04	0,08	0,51	1,10	0,74	0,71	0,71	0,71
C17:0	0,00	0,14	0,00	0,32	0,44	0,32	0,30	0,30	0,30
C17:1	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	3,56	5,14	3,95	5,95	4,40	3,96	4,03	4,09	4,03
C18:1 <i>cis-9</i>	22,07	17,21	35,69	20,30	12,68	18,50	17,54	16,95	16,71
C18:1 isômeros	0,00	1,70	0,95	3,01	0,99	1,16	1,09	1,09	1,07
C18:2 <i>cis cis</i>	59,94	49,93	40,03	31,73	30,66	36,56	39,86	41,40	42,20
C20:0	0,26	0,32	0,63	0,49	1,78	1,26	1,21	1,19	1,18
C18:3	1,36	5,61	0,94	5,47	10,71	7,89	7,39	7,35	7,31
C20:1	0,18	0,00	0,08	0,00	1,12	0,77	0,75	0,73	0,74
C22:0	0,58	0,50	0,22	0,52	1,10	0,77	0,85	0,88	0,89
C24:0	0,22	0,30	0,36	0,67	2,34	1,55	1,55	1,53	1,51
C24:1	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00

Ácidos graxos expressos g/100 g de AG totais

As amostras de fezes foram coletadas a intervalos de 26 horas a partir das 8:00 h do 11º até o 16º dia do período experimental. Após o término do experimento, as amostras de alimentos, fezes e sobras foram descongeladas, pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55° C, durante 72 a 96 horas e, posteriormente, moídas em moinho de facas dotado de peneira com perfurações de 1 mm.

Para a estimação dos coeficientes de digestibilidade aparente foi utilizada a fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno, obtida após 264 h (Casali et al., 2008) de incubação *in situ* dos alimentos fornecidos, sobras e fezes, utilizando sacos Ankon® (*filter bag F57*), segundo adaptação de Cochran et al. (1986). As amostras foram incubadas por 264 h em triplicata (20 mg de MS/cm²) no rúmen de duas vacas da raça Holandês recebendo dieta contendo silagem de milho e concentrado. Após a retirada do rúmen, o material remanescente da incubação foi submetido à extração com detergente neutro (Mertens, 2002) para quantificação dos teores de FDNi. Os valores de excreção fecal foram obtidos por intermédio da relação entre consumo e concentração fecal de FDNi.

As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (6:00 h e 14:00 h), fazendo-se o registro da produção de leite durante todo o período de coletas (11° ao 16° dias). Por meio de dispositivo acoplado à ordenhadeira, foram coletadas amostras de leite de, aproximadamente 300 mL, nas ordenhas da manhã e da tarde, fazendo-se amostras compostas para cada dia proporcionais às produções de leite nos períodos da manhã e tarde. Foram retiradas de cada amostra composta diária três alíquotas: a primeira (50 mL) foi acondicionada em frascos plásticos com conservante (Bronopol®), mantida entre 2 e 6°C, e encaminhada para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite, para determinação dos teores de lactose, gordura, nitrogênio total, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, segundo a técnica descrita pelo International Dairy Federation (1996); uma segunda alíquota foi desproteinizada com ácido tricloroacético (10 mL de leite misturados com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%), filtrado em papel-filtro, para posterior determinação do teor de nitrogênio não-proteico e o restante armazenado a -20°C, para posterior análise de alantoína e ureia; uma terceira alíquota (100 mL) foi armazenada a -20°C e, posteriormente, processada para análise do perfil de ácidos graxos.

A produção de leite corrigida para 3,5 % de gordura (PLC), foi calculada segundo Sklan et al. (1992): $PLC = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{ gordura do leite}) \times \text{produção de leite em kg/dia}$.

Ao final de cada período experimental foram feitas pesagens individuais dos animais para avaliar a variação de peso. Os pesos dos animais corresponderam às médias de duas pesagens, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas.

Amostras de sangue de todas as vacas foram coletadas no 16° dia por punção da veia coccígea, utilizando tubos de ensaio com anticoagulante (EDTA). Imediatamente, foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos, sendo então retiradas amostras de plasma e acondicionadas em recipientes de vidro e armazenadas a -20°C, para posteriores análises de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), glicose, colesterol, triglicérides, HDL e concentração de nitrogênio ureico. Para estimar o N-ureico do plasma sanguíneo, do leite e da urina, foi utilizado o fator de 0,466 que corresponde ao teor de N na ureia. Para a determinação de AGNE, foi utilizado *kit* comercial (Wako), adotando-se a metodologia de otimização de reagente proposta por Jonhson & Peters (1993). Os teores plasmáticos de glicose, colesterol, triglicérides e HDL foram determinados utilizando-se *kits* comerciais.

Amostras *spot* de urina de todas as vacas foram obtidas no 13^o dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção espontânea. Da urina coletada, após a homogeneização e filtragem, foram obtidas alíquotas de 10 mL que foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico 0,036 N, conforme descrito em Valadares et al. (1999), acondicionadas em recipientes plásticos, e armazenadas para posteriores análises de ureia, nitrogênio total, creatinina, ácido úrico e alantoína. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina, segundo Valadares Filho & Valadares (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/kg de peso corporal (PC) de creatinina (Chizzotti et al., 2006).

O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N-total) e o total de nitrogênio excretado nas fezes (N-fezes), na urina (N-urina) e no leite (N-leite). A determinação do nitrogênio total nas fezes e na urina foi feita segundo técnica descrita em Silva & Queiroz (2002).

O perfil de ácidos graxos do leite foi determinado, utilizando-se cromatógrafo de fase gasosa modelo 6890N (Agilent Technologies Inc., EUA) equipado com coluna CP-SIL 88 FAME 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm (Varian Inc., EUA) e detector de ionização de chama com condições de operação descritas por Cruz-Hernandez et al. (2007), e *software* Agilent ChemStation (Agilent Technologies Inc., EUA). A fração lipídica das amostras foi previamente extraída em solução de hexano-isopropanol (3:2), conforme descrito por Hara & Radin (1978). Em seguida, as frações lipídicas foram metiladas em solução básica de metóxido de sódio (Christie, 1982), antes da injeção no cromatógrafo. Este procedimento tem sido preferencialmente utilizado, pois catálises ácidas podem resultar na isomerização dos CLAs de configuração *cis-trans* ou *trans-cis* para configurações do tipo *trans-trans* (Kramer et al., 1997). As condições da corrida (fluxo de gás, gradiente de temperatura do forno, razão de “split”, etc.) foram descritas por Destillats et al. (2007). Os principais ácidos graxos das amostras foram identificados por comparação com os tempos de retenção observados em padrões apropriados (Sigma Diagnostics, PA); isômeros menores de C18:1 *trans/cis* e de CLA foram identificados com base em trabalhos publicados na literatura (Roach et al., 2002; Destillats et al., 2007). As amostras de cana-de-açúcar e dos concentrados, destinadas à análise do perfil de ácidos graxos, foram liofilizadas e, posteriormente, moídas em moinho de facas dotado de peneiras com abertura de malhas de 1 mm antes das etapas de extração e

metilação. A extração e metilação dos ácidos graxos das amostras de cana-de-açúcar, concentrados e óleo de girassol foram realizadas em uma só etapa (“one step”), conforme descrito por Sukhija & Palmquist (1988).

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), compostos nitrogenados totais (NT), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), extrato etéreo (EE) e lignina (LIG) seguiram as especificações descritas em Silva & Queiróz (2002). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram estimados segundo recomendações de Mertens (2002). As correções dos teores de cinzas e proteína contidos na FDN e na FDA foram conduzidas conforme recomendações de Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente. A determinação de nitrogênio não proteico (NNP) dos alimentos foi realizada segundo Licitra et al. (1996).

Os teores de carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (CNF_{cp}) foram calculados conforme Detmann & Valadares Filho (2010): $CNF_{cp} = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da ureia} + \%ureia) + \%FDN_{cp} + \%EE + \%Cinzas]$. Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados com adaptações ao descrito por Weiss (1999), pela seguinte equação: $NDT (\%) = PBD + FDN_{cpD} + CNF_{cpD} + 2,25EED$, em que: PBD= proteína bruta digestível; FDN_{cpD} = fibra em detergente neutro digestível; CNF_{cpD} = carboidratos não-fibrosos digestíveis; e EED= extrato etéreo digestível.

As análises de alantoína na urina e no leite foram feitas pelo método colorimétrico, segundo Fujihara et al. (1987), descrito por Chen & Gomes (1992). As determinações de creatinina, ácido úrico e ureia foram realizadas por meio de *kits* comerciais (Labtest). A excreção total de derivados de purina (DP) foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia. As purinas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de DP (Y, mmol/dia), por meio da equação $Y = 0,85X + 0,385 PC^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e $0,385 PC^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas (Verbic et al., 1990).

A síntese ruminal de compostos nitrogenados (N_{mic} , gN/dia) foi calculada em função das purinas microbianas absorvidas (PA, mmol/dia), utilizando-se a equação $N_{mic} = (70 * PA) / (0,83 * 0,116 * 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 a digestibilidade intestinal das purinas microbianas e 0,116 a relação N-purina:N-total nas bactérias (Chen & Gomes, 1992).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2002) adotando-se o nível de 5% de probabilidade para o erro tipo I. As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + (P/Q)_{ik} + (V/Q)_{il} + Q_x T_{ij} + e_{ijkl}, \text{ sendo:}$$

Y_{ijkl} = observação na vaca 1, no período k, submetida ao tratamento j, no quadrado latino i;

μ = constante geral;

Q_i = efeito do quadrado latino i, sendo $i = 1, 2, 3$;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos diferentes níveis de OG sobre os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e FDNcp. Porém, houve aumento linear ($P < 0,05$) para o consumo de extrato etéreo e redução linear ($P < 0,05$) no consumo de carboidratos não fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (Tabela 5).

Tabela 5 - Consumos diários de nutrientes de vacas alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)		
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q	
	kg/dia							
Matéria seca	15,7	15,9	16,1	14,8	0,539	ns ²	ns	
Matéria orgânica	15,4	15,0	15,0	14,1	0,520	ns	ns	
Proteína bruta	2,00	1,96	1,95	1,82	0,067	ns	ns	
Extrato etéreo	0,29	0,51	0,74	0,91	0,027	<0,001	ns	
FDN corrigida cinzas e proteína	5,64	5,62	5,50	5,27	0,205	ns	ns	
FDN indigestível	2,58	2,53	2,42	2,28	0,099	ns	ns	
CNF corrigido cinzas e proteína	7,87	7,30	7,21	6,44	0,273	0,001	ns	
Nutrientes digestíveis totais	11,8	11,8	12,2	11,7	0,447	ns	ns	
	g/kg do peso corporal							
Matéria seca	30,7	30,9	31,3	28,9	0,097	ns	ns	
FDN corrigida cinzas e proteína	11,6	11,5	11,4	10,7	0,038	ns	ns	
FDN indigestível	5,0	4,9	4,8	4,4	0,017	ns	ns	
	Equações de regressão						r^2	
Consumo de EE (kg/vaca/dia)					$\hat{y} = 0,297 + 0,139 * X$		0,93	
CNF corrigido cinzas e proteína (kg/vaca/dia)					$\hat{y} = 7,948 - 0,329 * X$		0,71	

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P > 0,05$); r^2 = coeficiente de determinação

Os consumos de PB não diferiram ($P>0,05$) para as dietas contendo diferentes teores de óleo de girassol. O teor de PB das dietas manteve-se próximo entre os tratamentos, porém foi um pouco abaixo em relação ao preconizado. Esse fato pode ser explicado devido ao baixo valor de proteína bruta encontrado na cana-de-açúcar (Tabela 2). Ressalta-se que as dietas foram formuladas para atender à exigência de 14,5% de PB (NRC, 2001).

A inclusão de óleo de girassol na dieta proporcionou maior consumo de EE ($P<0,05$) das vacas suplementadas com essa fonte lipídica, o que se explica devido ao aumento do teor de EE entre as dietas experimentais (Tabela 3) e por não ter havido diferença estatística no CMS (Tabela 5). De modo geral, o consumo de EE caracterizou a resposta dos animais aos teores de lipídios disponíveis na dieta.

O consumo e a digestibilidade da FDNcp, mostrados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, não diferiram entre as dietas. Isto sugere que a inclusão de OG permitiu equilíbrio nas populações dos micro-organismos ruminais, mantendo sua capacidade de hidrogenação de ácidos graxos insaturados, sobretudo dos celulolíticos. Contudo, o consumo de FDNcp foi próximo ao valor de 1,2% do peso corporal preconizado por Mertens (1994) para que vacas lactantes apresentem consumo ótimo de matéria seca.

Os consumos de CNFcp diminuíram linearmente ($P<0,05$) com o aumento dos teores de óleo de girassol nas dietas. Este resultado se explica em virtude das dietas com maiores teores de óleo apresentarem redução no teor de carboidratos em sua composição (Tabela 3).

Não foram verificadas diferenças entre as dietas ($P>0,05$) para os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, FDNcp e CNFcp (Tabela 6). Conforme Van Soest (1994), a digestibilidade e utilização dos nutrientes são uma descrição qualitativa do consumo dos alimentos. Neste contexto, pode-se observar que as digestibilidades aparentes dos nutrientes não variaram em função dos níveis dietéticos de óleo de girassol, assim como também os consumos de MS (em kg/dia e g/kg), (Tabela 5). Porém houve aumento linear ($P<0,05$) na digestibilidade aparente da PB e do EE, assim como no teor de nutrientes digestíveis totais entre as dietas.

Os dados do presente trabalho estão de acordo com os resultados de Silva et al. (2007) que também observaram maior coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo para dietas com óleo de soja, em comparação ao grão de soja, para cabras em lactação. A maior digestibilidade do EE com o aumento de óleo na dieta possivelmente seja

consequência da diluição das perdas endógenas ou da maior digestibilidade dos ácidos graxos insaturados presentes no OG.

O teor de NDT foi maior ($P < 0,05$) entre as dietas experimentais à base de óleo de girassol. Esse fato pode ser explicado em virtude de parte dos CNF ter sido substituído pelo extrato etéreo, fração 2,25 vezes mais energética. Entretanto, o consumo de NDT (kg/dia) não diferiu ($P > 0,05$) entre as dietas. A possível explicação seria que houve redução numérica no consumo de MS com o aumento da inclusão de OG na dieta.

Tabela 6 – Digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas experimentais

Itens	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)		
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q	
Matéria seca	70,9	71,1	69,6	71,5	0,820	ns	ns	
Matéria orgânica	71,7	72,1	72,7	72,8	0,556	ns	ns	
Proteína bruta	65,6	69,1	71,0	71,0	0,879	0,0003	ns	
Extrato etéreo	84,3	91,9	94,1	94,5	1,349	<0,0001	0,009	
FDN corrigida cinzas e proteína	44,1	44,4	45,3	46,5	1,001	ns	ns	
CNF corrigidos cinzas e proteína	94,1	94,4	93,7	93,6	0,320	ns	ns	
Nutrientes digestíveis totais	72,6	75,0	77,0	78,7	0,702	<0,0001	ns	
Equações de regressão							r ²	
Digestibilidade da proteína bruta					$\hat{y} = 66,809 + 1,060 * X$		0,83	
Digestibilidade do extrato etéreo					$\hat{y} = 74,486 + 11,824 * X$		0,77	
Teor de Nutrientes digestíveis totais					$\hat{y} = 73,211 + 1,166 * X$		0,92	

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P > 0,05$); r² = coeficiente de determinação

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos níveis de inclusão de óleo de girassol nas dietas sobre a produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura, e sobre os teores de proteína e lactose (Tabela 7). Porém, houve efeito linear decrescente dos níveis de óleo de girassol sobre os teores de gordura, sólidos totais no leite ($P < 0,05$) e sobre a produção de gordura (Tabela 7).

Trabalhando com vacas Holandês x Gir, recebendo capim-elefante picado no cocho e suplementado com diferentes níveis de óleo de soja (0; 1,5; 3,0 e 4,5%) na MS das dietas, Ribeiro et al. (2007) também não observaram efeito dos tratamentos sobre o consumo de matéria seca e sobre a produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura. Mas, da mesma forma que no presente trabalho, também relataram que houve redução linear na produção e no teor de gordura do leite ($P < 0,05$) com a inclusão do óleo vegetal na dieta das vacas. Uma provável explicação é o aumento na concentração do isômero CLA *trans*-10 *cis*-12 observado na Tabela 11. A identificação do CLA *trans*-10 *cis*-12 como responsável pela redução da secreção de gordura do leite

(Baumgard et al., 2000), pode ser explicada, em parte, pela inibição de enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase (Piperova et al., 2000), que são responsáveis pela *síntese de novo* dos ácidos graxos de cadeias curta e média (de 4 a 16 carbonos) secretados no leite.

Tabela 7 – Parâmetros da qualidade do leite para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG				EPM	Efeito (valor de P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
Produção de leite (kg/dia)	18,0	18,3	17,4	19,2	0,501	ns ²	ns
Produção corrigida (kg/dia)	17,8	17,7	15,8	16,6	0,592	ns	ns
Gordura (%)	3,43	3,28	2,89	2,67	0,145	0,001	ns
Produção gordura (kg/dia)	0,618	0,608	0,501	0,512	2,993	0,023	ns
Proteína (%)	3,03	2,79	2,93	2,90	0,058	ns	ns
Produção proteína (kg/dia)	0,543	0,511	0,510	0,555	1,585	ns	ns
Lactose (%)	4,30	4,35	4,39	4,24	0,052	ns	ns
Produção lactose (kg/dia)	0,772	0,796	0,767	0,816	2,529	ns	ns
Sólidos totais (%)	11,76	11,32	11,07	10,66	0,181	0,005	ns
Produção ST (kg/dia)	2,11	2,07	1,93	2,04	6,250	ns	ns
Extrato desengordurado (%)	8,33	8,04	8,18	7,99	0,089	ns	ns
Produção ESD (kg/dia)	1,49	1,47	1,43	1,53	4,281	ns	ns
Escore Linear para CCS	4,68	4,70	5,00	4,70	0,358	ns	ns
Peso corporal médio (kg)*	509,8	506,9	468,0	476,6	0,21	-	-
Variação de peso (kg/dia)*	1,22	1,48	0,97	1,06	0,18	-	-
Equações de regressão							r ²
Gordura (%)	$\hat{y} = 3,494 - 0,178 * X$						0,78
Produção gordura (g/dia)	$\hat{y} = 629,577 - 28,223 * X$						0,57
Sólidos totais (%)	$\hat{y} = 11,786 - 0,236 * X$						0,75

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo (P>0,05); r² = coeficiente de determinação; *Não analisado estatisticamente

Peterson et al.(2002) observaram reduções significativas (aproximadamente, 17%) no teor e na produção de gordura do leite. Também Baumgard et al. (2000), ao utilizarem diferentes doses de CLA sintético, observaram reduções em até 50% na síntese de gordura na glândula mamária de vacas em lactação. Recentes estudos têm apontado que a ligação dupla *trans* no carbono 10 é a responsável pela alteração no teor de gordura do leite e, além do C18:1 *trans*-10 e C18:2 *trans*-10 *cis*-12, outros isômeros do CLA apresentam potencial para deprimir a gordura do leite, entre eles o C18:2 *cis*-8 *trans*-10, C18:3 *cis*-8 *trans*-10 *cis*-12 e C18:3 *trans*-10 *cis*-12 *cis*-15 (Chouinard et al., 2001; Piperova et al., 2000).

Para comprovar o potencial de depressão do isômero CLA *trans*-10 *cis*-12, Baumgard et al. (2002) infundiram 13,5 g/animal/dia de CLA e observaram 42% de

redução na gordura do leite e 63% de redução na *síntese de novo*. Os autores avaliaram a expressão gênica mRNA de enzimas envolvidas na síntese lipídica: acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintetase, Δ -9 dessaturase, lipase lipoproteica, proteína ligada ácido graxo, glicerol-P aciltransferase e acilglicerol-P aciltransferase. Os autores encontraram 82% de diminuição da capacidade lipogênica, redução de 61% na oxidação do acetato a CO₂ e redução na expressão do mRNA das enzimas de 39 e 54%. Os autores concluíram que o CLA *trans*-10 *cis*-12 inibe a síntese de gordura a partir de

mecanismos que envolvem todo o processo de síntese, ou seja, o transporte e captura dos ácidos graxos circulantes, a *síntese de novo*, a dessaturação e a formação dos triglicerídeos.

Por não apresentar distribuição normal, a contagem de células somáticas (CCS) foi transformada para a escala logarítmica em escore de células somáticas, conforme recomendado por Dabdoub & Shook (1984): $ECS = [\log_2(CCS/100.000)] + 3$. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as dietas experimentais para o escore de CCS (Tabela 7). A contagem de células somáticas (CCS) tem sido considerada, medida padrão de qualidade, pois está relacionada com a composição, rendimento industrial e segurança do leite. Devido à ação de lipases leucocitárias e lipoproteicas, a concentração de gordura no leite com elevada CCS tende a diminuir (Harmon, 1994). Neste contexto, a caseína do leite sofre expressiva redução quando a CCS aumenta, devido à ação de proteases leucocitárias e sanguíneas. Por outro lado, ao mesmo tempo ocorre aumento da concentração de proteínas plasmáticas no leite em decorrência da resposta inflamatória.

Houve redução linear ($P < 0,05$) para os consumos e excreções fecais de compostos nitrogenados (Tabela 8). Não houve efeito da inclusão do óleo de girassol nas dietas ($P > 0,05$) sobre o N ureico urinário, N ureico no leite e eficiência de síntese microbiana. Houve redução linear ($P < 0,05$) para a excreção de derivados urinários de purinas (DP), para os DP absorvidos e, conseqüentemente, para a produção de N microbiano, com o aumento dos teores de óleo de girassol nas dietas (Tabela 8).

Tabela 8 – Médias de parâmetros da eficiência de utilização de nitrogênio para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG				EPM	Efeito (valor P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
Nitrogênio ingerido (g)	320,9	314,0	312,3	290,0	10,7	0,084	ns ²
Nitrogênio fecal (g)	111,0	97,2	90,6	84,2	4,15	0,0001	ns
Nitrogênio urinário (g)	132,7	131,3	126,2	135,1	4,32	ns	ns
Nitrogênio no leite (g)	88,0	83,0	85,3	89,9	2,95	ns	ns
Balanço N (g)	-10,2	2,6	10,1	-17,2	6,35	ns	0,02
Balanço N (% de N ingerido)	-3,6	0,2	2,2	-5,8	1,93	ns	0,01
Nitrogênio uréico urina (mg/kgPC)	166,2	145,5	135,1	141,2	13,94	ns	ns
Nitrogênio ureico no leite (mg/dL)	12,9	14,0	12,8	11,1	0,79	ns	ns
Nitrogênio ureico no plasma (mg/dL)	12,1	10,2	9,2	9,1	0,67	0,008	ns
Purinas totais (mmol)	290,6	281,1	282,7	263,2	7,96	0,049	ns
Purinas absorvidas (mmol)	292,4	281,4	284,0	260,8	9,27	0,038	ns
N microbiano ruminal (g)	212,6	204,6	206,5	189,6	6,74	0,038	ns
Eficiência Mic (gPB/kg NDT)	114,0	108,5	114,5	101,8	4,00	ns	ns
Equações de regressão							r ²
Nitrogênio ingerido (g)	$\hat{y} = 324,363 - 5,998 * X$						0,49
Nitrogênio fecal (g)	$\hat{y} = 108,093 - 5,412 * X$						0,67
Balanço N (g)	$\hat{y} = -12,828 + 18,89 * X - 4,345 * X^2$						0,68
Balanço N (% de N ingerido)	$\hat{y} = -4,236 - 5,516 * X - 1,285 * X^2$						0,70
Nitrogênio ureico no plasma (mg/dL)	$\hat{y} = 11,812 - 0,709 * X$						0,55
Purinas totais (mmol)	$\hat{y} = 292,838 - 5,371 * X$						0,76
Purinas absorvidas (mmol)	$\hat{y} = 294,809 - 6,1400 * X$						0,70
N microbiano ruminal (g)	$\hat{y} = 214,340 - 4,464 * X$						0,68

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo (P>0,05); r² = coeficiente de determinação

Entretanto, o consumo de nitrogênio apenas não é suficiente para inferir se as exigências proteicas foram atendidas. O metabolismo proteico pode sofrer influência de diversos fatores levando a diferenças na resposta quanto à eficiência de utilização de N. Nesse contexto, níveis elevados de excreção de N urinário podem indicar excesso de ingestão de N ou desbalanço de energia:nitrogênio ruminal, principalmente quando a origem da energia é lipídica. Nesse caso, os micro-organismos não têm capacidade de utilizar lipídeos como fonte de energia para manutenção e crescimento (Santos, 2006).

Os dados do presente trabalho corroboram com os resultados obtidos por Eifert et al. (2005) que observaram reduções da síntese de proteína microbiana, quando dietas contendo óleo de soja com adição ou não de ionóforo foram fornecidas às vacas. Suplementos lipídicos ricos em ácidos graxos poli-insaturados geralmente interferem na síntese de proteína microbiana, pelo possível efeito tóxico sobre os micro-organismos

(Doreau & Ferlay, 1995) ou pela substituição de fontes de energia fermentável (Nagaraja et al., 1997).

Houve aumento ($P>0,05$) da concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados, colesterol total e de triglicerídeos para as vacas alimentadas com níveis crescentes de óleo de girassol (Tabela 9). Esse aumento da concentração dos componentes lipídicos plasmáticos pode ser justificado em razão do maior consumo de ácidos graxos nas dietas experimentais, que proporcionou aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídeos transportados no sangue.

Tabela 9 – Médias de parâmetros sanguíneos para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Variável	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
Glicose (mg/dL)	55,28	58,66	56,89	62,35	2,710	ns ²	ns
AGNE (mmol/L)	0,14	0,17	0,19	0,22	0,015	0,0147	ns
Colesterol (mg/dL)	84,82	114,44	121,53	144,86	5,088	0,0001	ns
HDL (mg/dL)	61,92	70,47	63,65	65,65	4,206	ns	ns
Triglicerídeos (mg/dL)	2,66	2,45	4,17	3,83	0,353	0,0029	ns
Equações de regressão							r ²
AGNE (mmol/L)	$\hat{y} = 0,145 + 0,015 \cdot X$						0,72
Colesterol (mg/dL)	$\hat{y} = 91,732 + 11,885 \cdot X$						0,68
Triglicerídeos (mg/dL)	$\hat{y} = 2,489 + 0,349 \cdot X$						0,77

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P>0,05$); r² = coeficiente de determinação

De acordo com Jenkins & Jenny (1989), níveis mais elevados de lipídeos no sangue são encontrados quando ocorre aumento da absorção no intestino de gordura dietética ou pelo aumento da mobilização no tecido adiposo.

A concentração de glicose plasmática não foi influenciada pelas dietas experimentais, sendo este resultado semelhante aos valores relatados por Elliott et al. (1993). Os níveis de glicose circulante em ruminantes são geralmente baixos e relativamente constantes, exceto no início da lactação, onde a demanda por nutrientes é alta e a falta de glicose pode levar o animal a desenvolver doenças metabólicas. Poucos trabalhos têm associado os níveis de glicose e a suplementação lipídica. Garnsworthy (2002) alertou que a disponibilidade de glicose tende a ser menor devido à substituição do amido por gordura na dieta, o que acarreta maior produção de propionato no rúmen.

Segundo Gagliostro & Chilliard (1992), diversos mecanismos de economia de glicose pelo organismo dos ruminantes podem explicar a manutenção da glicemia, como a diminuição na oxidação da glicose para produzir NADPH necessário para a lipogênese *de novo*, devido à inibição da mesma nos tecidos adiposo e mamário frente ao aporte de lipídeos; diminuição da oxidação da glicose para produção de ATP, que pode ser produzido a partir da oxidação dos ácidos graxos exógenos; possível aumento na gliconeogênese hepática, como consequência de menor concentração plasmática de insulina e aumento da concentração do hormônio do crescimento e, finalmente, eventual resistência à insulina do organismo suplementado com lipídeos, que poderia contribuir para manter a glicemia.

Segundo Grummer & Carroll (1991), o aumento nos teores de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) na corrente sanguínea de vacas em lactação suplementadas com lipídeos se deve à incompleta captura destes pelos tecidos após a hidrólise dos triglicerídeos de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) pela lipoproteína lipase e/ou a um aumento na hidrólise de triglicerídeos do tecido adiposo.

A elevação dos níveis de triglicerídeos sanguíneos foi frequentemente observada em trabalhos onde foram estudados os efeitos da suplementação lipídica à dieta (Smith et al., 1978; Chow et al., 1990 e, provavelmente, reflete o aumento na digestão e captura de ácidos graxos a partir da gordura fornecida (Ávila et al., 2000).

Houve diferença para os teores e produção diária de quase todas as classes de ácidos graxos (Tabela 10). As concentrações dos ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) na gordura do leite foram reduzidas ($P < 0,05$) com a inclusão de óleo de girassol na dieta. Os resultados encontrados são benéficos, pois diversas pesquisas têm sido direcionadas no sentido de diminuir os teores de ácidos graxos saturados de cadeia média com foco na redução do risco de doenças cardiovasculares (Dewhurst et al., 2006). Eifert et al. (2006) também encontraram redução da participação de ácidos graxos de cadeia curta e média no leite, quando foi adicionado óleo de soja à dieta das vacas.

A inclusão de óleo de girassol na dieta promoveu aumento ($P < 0,05$) da concentração do ácido esteárico (18:0) na gordura do leite, que passou de 7,78 g/100 g na dieta controle para 11,73; 12,89 e 13,42 g/100 g nas dietas com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente. O aumento dos teores de ácido esteárico e oleico deve-se, provavelmente, ao elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa presentes no óleo de girassol (Tabela 4) que após passarem total ou parcialmente pela

biohidrogenação são incorporados à gordura do leite. De acordo com Looor et al.(2005), o ácido oleico sintetizado pela Δ^9 dessaturase a partir do C18:0 derivado do plasma é requerido para a síntese de triglicerídeos da gordura do leite, importante para a manutenção da fluidez do glóbulo de gordura dentro da célula mamária.

O teor de ácido esteárico indica o grau de biohidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados no rúmen. A etapa inicial para biohidrogenação do ácido linoleico é uma reação de isomerização que converte a dupla ligação *cis*-12 no ácido graxo poli-insaturado para seu isômero *trans*-11. As etapas de redução subsequentes originarão o ácido *trans* vaccênico (C18:1 *trans*-11) . A extensão na qual o ácido *trans* vaccênico é hidrogenado a C18:0 depende das condições do rúmen e a maior quantidade de ácidos linoléico parece inibir de forma irreversível esta reação (Jenkins, 1993).

A inclusão de fontes de óleo de girassol à dieta aumentou a concentração de CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11 na gordura do leite ($P<0,05$) (Tabela 11). As dietas suplementadas propiciaram conteúdo de CLA superior em relação à dieta controle, com médias de 0,54; 1,40; 2,34 e 2,75% para os tratamentos controle; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente. O CLA presente na gordura do leite é proveniente, em parte, da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico, sendo a outra parte resultante da atividade da enzima Δ -9 dessaturase nas células da glândula mamária, que transformam o ácido vaccênico absorvido da corrente sanguínea em CLA (Bauman & Griinari, 2001). Dessa forma, espera-se que, quanto maior a concentração do C18:2 na dieta, maiores as chances de elevar a concentração de CLA na gordura do leite. Este comportamento foi evidenciado neste estudo, pois o óleo de girassol é fonte de ácido linoleico. Houve redução na concentração dos AG de cadeia ímpar com a inclusão de OG na dieta, o que pode ser consequência da redução na síntese bacteriana no rúmen (Vlaeminck et al., 2006).

No presente trabalho o teor de C18:1 *trans*-11 passou de 1,12% no tratamento controle para 3,36; 6,42 e 7,54% nas dietas com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 11), o que representa aumento de 300, 573 e 673% quando comparado ao tratamento controle. Esse incremento refletiu no teor de CLA *cis*-9 *trans*-11 presente no leite, já que segundo Kay et al.(2004), a síntese endógena é responsável por grande parte, cerca de 64 a 93% de todo CLA *cis*-9 *trans*-11 presente no leite, sendo precursor o C18:1 *trans*-11 que escapa do processo de biohidrogenação ruminal. Esses resultados estão de acordo com Eifert et al.(2006), que encontraram o ácido vaccênico como o principal isômero *trans* encontrado no leite para o tratamento com inclusão de

óleo de soja, sendo esse aumento de 230%. Outro ponto importante que deve ser levado em consideração é a bioconversão do ácido vaccênico (C18:1 *trans*-11) em CLA (C18:2 *cis*-9 *trans*-1). De acordo com Jutzeler van Wijlen & Colombani (2010) 20 a 25% do ácido vaccênico consumido é metabolizado em CLA no organismo humano, ou seja, beber leite enriquecido com ácido vaccênico é interessante do ponto de vista de saúde humana.

A composição do óleo de girassol pode ser observada na Tabela 4, onde observa-se que ele contém 59,94% de ácido linoleico, 1,36% de linolênico e 22,07% de oleico e, concomitantemente à redução verificada na concentração de ácidos graxos saturados, houve elevação ($P < 0,05$) na concentração de ácidos graxos insaturados na gordura do leite que passou de 2,77% no controle para 4,12; 5,20 e 5,29% nas dietas com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 12).

Foi observado incremento linear ($P < 0,001$) na concentração do ácido rumênico, sendo este aumento de, aproximadamente, 509% na dieta com maior inclusão de OG em relação à controle. Segundo Kepler & Tover (1967), o ácido rumênico é o primeiro intermediário na biohidrogenação do ácido linoleico dietético, por meio da ação enzimática (*cis*-12, *trans*-11 octadecanodienoato isomerase) da bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. Este passo inicial requer, no entanto, previa lipólise dos galactolipídeos, fosfolipídeos e triglicerídeos da dieta, disponibilizando ácidos graxos não-esterificados com radicais carboxila livres (Kepler et al., 1970). Assim, a etapa inicial de isomerização é seguida pela saturação da dupla ligação *cis*-9 por meio da ação da enzima *cis*-9, *trans*-11 linoleatoato redutase. E o produto desta redução é o ácido vaccênico (ácido C18:1 *trans*-11), o principal isômero *trans* do leite, manteiga e tecidos de ruminantes (Bessa et al., 2000).

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos saturados no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C4:0	4,36	4,43	3,75	2,98	0,216	<0,0001	ns	$\hat{y} = 4,604 - 0,322*X$	0,76
C6:0	2,66	2,43	1,78	1,34	0,11	<0,0001	ns	$\hat{y} = 2,743 - 0,305*X$	0,88
C8:0	1,5	1,34	0,88	0,66	0,072	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,543 - 0,198*X$	0,89
C10:0	3,24	2,66	1,8	1,4	0,149	<0,0001	ns	$\hat{y} = 3,233 - 0,425*X$	0,89
C11:0	0,49	0,33	0,19	0,13	0,029	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,467 - 0,081*X$	0,90
C12:0	4,02	3,06	2,18	1,72	0,141	<0,0001	ns	$\hat{y} = 3,920 - 0,518*X$	0,89
C13:0	0,14	0,1	0,07	0,05	0,011	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,138 - 0,020*X$	0,84
C14:0	12,25	10,76	8,73	7,27	0,251	<0,0001	ns	$\hat{y} = 12,298 - 1,131*X$	0,88
C15:0	1,62	1,13	0,92	0,84	0,078	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,515 - 0,171*X$	0,82
C16:0	34,38	26,9	22,5	20,01	1,03	<0,0001	ns	$\hat{y} = 33,074 - 3,167*X$	0,84
C17:0	0,51	0,43	0,45	0,42	0,021	0,0178	ns	$\hat{y} = 0,486 - 0,016*X$	0,73
C18:0	7,78	11,73	12,89	13,42	0,54	<0,0001	0,003	$\hat{y} = 7,891 + 2,917*X - 0,380*X^2$	0,94
C20:0	0,11	0,13	0,13	0,14	0,005	0,0039	ns	$\hat{y} = 0,115 + 0,005*X$	0,86
C22:0	0,04	0,06	0,06	0,08	0,006	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,040 + 0,008*X$	0,85
C21:0	0,02	0,03	0,05	0,08	0,009	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,017 + 0,012*X$	0,72
∑AG saturados total ímpar	2,79	2,01	1,66	1,5	0,111	<0,0001	ns	$\hat{y} = 2,622 - 0,281*X$	0,86
∑AG saturados cadeia curta total	11,96	10,93	8,44	6,5	0,512	<0,0001	ns	$\hat{y} = 12,288 - 1,256*X$	0,90
∑AG saturados cadeia média total	54,29	42,2	34,78	30,94	1,079	<0,0001	ns	$\hat{y} = 52,225 - 5,163*X$	0,91
∑AG saturados cadeia longa total	7,9	11,98	13,44	14,04	0,49	<0,0001	ns	$\hat{y} = 8,860 + 1,324*X$	0,94
∑AG saturados total	74,6	65,12	56,83	51,43	1,357	<0,0001	ns	$\hat{y} = 73,372 - 5,095*X$	0,91

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos octadecenoicos *cis*, *trans* e conjugados no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C18:1 <i>trans</i> -4	0,01	0,03	0,04	0,06	0,004	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,013 + 0,0098*X$	0,79
C18:1 <i>trans</i> -5	0,01	0,02	0,04	0,06	0,006	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,011 + 0,010*X$	0,76
C18:1 <i>trans</i> 6-8	0,1	0,26	0,49	0,67	0,047	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,090 + 0,129*X$	0,88
C18:1 <i>trans</i> -9	0,16	0,32	0,48	0,61	0,036	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,168 + 0,100*X$	0,90
C18:1 <i>trans</i> -10	0,25	0,6	1,71	4,06	0,616	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,770*X$	-
C18:1 <i>trans</i> -11	1,12	3,36	6,42	7,54	0,391	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,276 + 1,482*X$	0,86
C18:1 <i>trans</i> -12	0,18	0,53	0,91	1,2	0,054	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,190 + 0,228*X$	0,91
C18:1 <i>trans</i> -13 e <i>trans</i> -14	0,25	0,61	0,98	1,1	0,061	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,299 + 0,194*X$	0,92
C18:1 <i>cis</i> -9 + C18:1 <i>trans</i> -15	14,69	18,28	19,73	20,49	0,668	<0,0001	ns	$\hat{y} = 15,616 + 1,256*X$	0,67
C18:1 <i>cis</i> -11	0,95	1,12	1,29	1,32	0,049	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,979 + 0,086*X$	0,72
C18:1 <i>cis</i> -12	0,3	0,57	0,73	0,69	0,046	<0,0001	0,001	$\hat{y} = 0,296 + 0,247*X - 0,035*X^2$	0,78
C18:1 <i>cis</i> -13	0,05	0,07	0,1	0,16	0,014	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,043 + 0,024*X$	0,79
C18:1 <i>trans</i> -16	0,17	0,32	0,53	0,49	0,034	<0,0001	0,013	$\hat{y} = 0,153 + 0,171*X - 0,020*X^2$	0,82
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,07	0,15	0,18	0,18	0,014	<0,0001	0,013	$\hat{y} = 0,072 + 0,060*X - 0,008*X^2$	0,70
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	1,87	1,99	2,08	2,03	0,107	ns	ns	-	-
Isômeros do C18:3 n-3	0,09	0,09	0,08	0,09	0,005	ns	ns	-	-
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,14	0,12	0,13	0,12	0,009	ns	ns	-	-
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,54	1,4	2,34	2,75	0,244	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,672 + 0,503*X$	0,64
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,02	0,05	0,07	0,1	0,005	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,025 + 0,016*X$	0,80
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,01	0,03	0,06	0,11	0,012	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,022*X$	0,82
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11+ <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,04	0,09	0,13	0,2	0,016	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,035 + 0,034*X$	0,82

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

Tabela 12 - Perfil de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito (valor de P)		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		L	Q		
C15:0 iso	0,25	0,21	0,17	0,14	0,01	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,247 - 0,024 * X$	0,82
C15 anteiso	0,43	0,37	0,35	0,3	0,016	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,425 - 0,029 * X$	0,70
C14:1 <i>cis</i> -9	1,13	0,82	0,61	0,54	0,041	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,097 - 0,133 * X$	0,86
C16:1 <i>cis</i> -9	1,6	1,03	0,82	0,82	0,062	<0,0001	0,009	$\hat{y} = 1,619 - 0,452 * X + 0,062 * X^2$	0,87
C17:1 <i>cis</i> -10	0,21	0,15	0,14	0,14	0,006	<0,0001	0,004	$\hat{y} = 0,210 - 0,041 * X + 0,005 * X^2$	0,82
C20:1 <i>cis</i> -11	0,04	0,04	0,06	0,07	0,003	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,037 + 0,007 * X$	0,84
C20:2 <i>cis</i> -11 <i>cis</i> -14	0,03	0,02	0,02	0,02	0,006	ns	ns	-	-
C20:3 n-6	0,08	0,07	0,05	0,05	0,006	0,0157	ns	$\hat{y} = 0,076 - 0,005 * X$	0,66
C20:4 n-6	0,16	0,11	0,1	0,08	0,008	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,149 - 0,0016 * X$	0,68
C24:0	0,04	0,04	0,03	0,04	0,006	ns	ns	-	-
∑AG monoinsaturados par <i>cis</i>	18,04	22,07	23,21	23,4	0,747	0,0004	ns	$\hat{y} = 19,367 + 1,102 * X$	0,77
∑AG monoinsaturados par <i>trans</i>	2,14	6,32	11,76	15,89	0,709	<0,0001	ns	$\hat{y} = 2,029 + 3,111 * X$	0,93
∑AG monoinsaturados par total	20,2	28,46	35,02	39,51	1,106	<0,0001	ns	$\hat{y} = 21,398 + 4,213 * X$	0,91
∑AG monoinsaturado ímpar total	0,86	0,74	0,69	0,56	0,018	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,861 - 0,009 * X$	0,79
∑AG monoinsaturados total	21,06	29,2	35,7	40,07	1,103	<0,0001	ns	$\hat{y} = 22,260 + 4,146 * X$	0,91
∑AG ímpar total	3,66	2,75	2,35	2,05	0,12	<0,0001	ns	$\hat{y} = 3,483 - 0,347 * X$	0,88
∑AG poli-insaturados	2,77	4,12	5,2	5,29	0,229	<0,0001	ns	$\hat{y} = 3,117 + 0,556 * X$	0,75

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

A atividade da enzima Δ^9 dessaturase na glândula mamária pode ser indicada indiretamente pela relação existente entre alguns ácidos graxos presentes no leite (14:1/14:0; 16:1/16:0; 18:1/18:0, CLA/linoleico, CLA/vaccênico). Dentre essas relações, a que melhor afere esta atividade é a relação entre o ácido miristoleico e o mirístico (C14:1 *cis*-9/C14:0), devido ao fato de o C14:1 *cis*-9 apresentar teores elevados no leite, enquanto na digesta sua concentração é baixa ou elemento traço (Lock & Garnsworthy, 2003; Fievez et al., 2003). A avaliação da atividade dessa enzima é de suma importância em estudos que visam estudar o teor de CLA na gordura do leite, sendo o par que apresenta a melhor indicação da atividade da enzima é o C14 já que o C14:0 é sintetizado na glândula mamária e o aparecimento de seu produto (C14:1 *cis*-9) na gordura do leite é quase que em sua totalidade resultado da atividade da Δ^9 dessaturase (Griinari et al., 2000).

Houve diferença ($P < 0,05$) no índice de dessaturase entre as dietas para os pares C14 e C18 (Tabela 13). Contudo, houve efeito para o delta CLA que foi linearmente decrescente entre os tratamentos. Os fatores que afetam a atividade da Δ^9 dessaturase não estão muito bem explicados, mas provavelmente são influenciados por fatores genéticos, estágio da lactação e nutrição dos animais (Lock & Garnsworthy, 2003). Griinari et al. (2000) confirmaram em seu trabalho a importância da Δ^9 dessaturase na produção do ácido oleico e observaram que a atividade desta enzima é a maior fonte dos ácidos miristoleico e palmitoleico encontrados na gordura do leite. Os mesmos autores comprovaram que a síntese endógena do CLA, via Δ^9 dessaturase, é a maior fonte deste isômero no leite de ruminantes.

Tabela 13 – Índice de dessaturase de vacas alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Produto/substrato	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
C _{14:1} /C _{14:0}	0,09	0,07	0,07	0,07	0,0041	0,0264	ns
C _{16:1} /C _{16:0}	0,04	0,04	0,04	0,04	0,0027	ns	ns
C _{18:1} /C _{18:0}	1,86	1,57	1,50	1,47	0,0690	0,0051	ns
Delta CLA	0,49	0,42	0,13	0,20	0,0160	<0,0001	ns

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo ($P > 0,10$)

Fatores dietéticos e modificação do ambiente ruminal promovem diferenças significativas nos padrões de biohidrogenação, levando à formação de determinados intermediários em detrimento de outros. Neste contexto, as diversas rotas do processo de biohidrogenação estão associadas a enzimas específicas e espécies de bactérias que ainda não estão claramente compreendidos.

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) da inclusão de OG na dieta sobre o teor do CLA *trans*-10 *cis*-12, um AG comprovadamente inibidor da síntese de gordura do leite (Tabela 14). Neste sentido, observou-se decréscimo ($P = 0,02$) de 0,079 unidades percentuais no teor de gordura para cada 1% de incremento na concentração de CLA *trans*-10 *cis*-12. Este resultado pode apresentar implicações financeiras para o produtor de leite, haja vista que grande parte dos laticínios brasileiros possui programas de bonificação de pagamento por composição do leite, notadamente quanto aos teores de proteína e gordura.

O efeito do CLA *trans*-10, *cis*-12 na redução da síntese de lipídeos na glândula mamária é devido, pelo menos em parte, à inibição da atividade das enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e sintetase de ácido graxo (Piperova et al., 2000). Ainda segundo os mesmos autores, a redução do conteúdo de gordura do leite tem sido mostrada ser principalmente decorrente da redução de ácidos graxos sintetizados *de novo* pela glândula mamária.

Tabela 14 – Relações entre substratos e produtos da enzima Δ^9 dessaturase no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Equações de regressão	r^2
C14:1 <i>cis</i> -9 = 0,08305*(C14:0)	0,92
C16:1 <i>cis</i> -9 = 0,0472*(C16:0)	0,92
C18:1 <i>cis</i> -9 = 10,947 + 0,654* (C18:0)	0,22
C18:1 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 = 0,3878 *(C18:1 <i>trans</i> -11)	0,92
% de Gordura = 3,5137 – 7,9543*(CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12)	0,46
% de Gordura = 3,504 – 6,6428*(CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11)	0,12
% de Gordura = 3,716 – 5,479*(CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12+ CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11)	0,45

Inúmeros estudos têm demonstrado o potencial nutracêutico do CLA. Como o leite de ruminantes constitui a principal fonte de CLA na dieta humana, o aumento da sua concentração no leite pode resultar em aumentos expressivos da ingestão de CLA pela população humana. A manipulação da dieta dos animais é forma mais eficaz de se aumentar o teor de CLA no leite, considerando tanto a magnitude quanto a rapidez da resposta observada. Entretanto, este aumento pode ser transitório, de forma que outros isômeros de CLA podem ser formados durante o período de suplementação, os quais podem resultar em queda do teor de gordura do leite. A produção de leite com baixo teor de gordura pode trazer prejuízos econômicos ao produtor, especialmente em sistemas de pagamento por qualidade.

O equilíbrio entre a produção e a saúde das vacas é instável sob determinadas condições, sendo uma necessidade técnica estabelecer as causas de variação na composição do leite para manter um sistema de produção sadio e economicamente rentável. Sobre esse ponto, produzir leite com baixo teor de gordura é benéfico para vaca, pois possibilita menor gasto energético necessário para a produção de leite.

Do ponto de vista tecnológico, essa informação pode proporcionar novos nichos de mercados para a comercialização de produtos lácteos com características nutracêuticas.

CONCLUSÃO

A inclusão de até 4,5% de óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar para vacas Holandês x Gir não afeta o consumo de matéria seca e a produção de leite, além de reduzir a quantidade de ácidos graxos de cadeia média e aumentar o teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o CLA, tornando o leite mais saudável para consumo humano. Porém, reduções nos teores de sólidos do leite, como a gordura pode representar implicações financeiras ao produtor tendo em vista os programas de bonificação adotados pelos laticínios brasileiros.

LITERATURA CITADA

- AMARAL NETO, J.; OLIVEIRA, M.D.S.; LANÇANOVA, J.A.C. et al. Composição químico-bromatológica da silagem de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. (CD-ROM).
- ANDRADE, A. D. **Ácidos graxos ômega-3 em peixes, óleos de peixes e óleos vegetais comestíveis**. 1994, Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR, 1994.
- AVILA, C.D., E.J. DEPETERS, H. PEREZ-MONTI, S.J. TAYLOR, and R.A. ZINN. 2000. Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 83:1505.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15-29, 2001.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO. A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.278, p.R179-R184, 2000.
- BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression og genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.2155-2163, 2002.
- BRIEGER, F.O. Início da safra. Como determinar a maturação. Boletim Informativo Coperest, São Paulo, v.4, 1968. 1-3p.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details (Occasional publication). **International Feed Resources Unit**, Bucksburnd, Aberdeen:Rowett Research Institute. 21p. 1992.
- CHILLIARD, Y.; BOCQUIER F. Effects of fat supplementation on milk yield and composition in dairy goats and ewes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM “LA QUALITA NELLE PRODUZINI DEI PICCOLI RUMINANTI”, 5., 1993, Varese. **Proceedings...** Varese: Camera di Commercio Industria Artigiano Agricoltura di Varese, 1993. p.61-78.
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; CAMPOS, J.M.S.; MARCONDES, M.I.; FONSECA, M.A. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1813-1821, 2006.
- CHOUINARD, P.Y.; CORNEAU, L.; BUTLER, W.R.; CHILLIARD, Y.; RACKLEY, J.K.; BAUMAN, D.E. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentration in milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.680-690, 2001.

- CHOW, J.M., E.J. DePETERS, and R.L. BALDWIN. 1990. Effect of rumen-protected methionine and lysine on casein in milk when diets high in fat or concentrate are fed. **Journal of Dairy Science**.73:1051.
- CHRISTIE, W.W., J.L. CLAPPERTON, J.L. 1982. Structures of the triglycerides of cows' milk, fortified milks, including infant formulae and human milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**. 35:22-24.
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D. et al. Predicting digestibility diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1476-1483, 1986.
- CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J.K.G.; KENNELLY, J.J. et al. Evaluating the conjugated linoleic acid trans 18:1 isomers in milk fat dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.3786-3801, 2007.
- DABDOUB, S.A.M.; SHOOK, G.E. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count, and clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.163-4, 1984. Supplement 1.
- DESTAILLATS, F.; GOLAY, P.A.; JOFFRE, F.; Wispelaere, M.; Hug, B.; Giuffrida, F.; Fauconnot, L.; Dionisi, F. 2007. Comparison of available analytical methods to measure trans-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. **Journal of Chromatography A**, v.1145, p.222-228.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 62, n. 4, Aug. 2010 .
- DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J; LEE, M.R.F. et al. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science & Technology**, v.131, p.168–206, 2006.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W.; GALLI, M.P.; ALBRIGHT, K.; TOLOSA, M.X. conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic acid. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.5, p.1016-1026, 2000.
- DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. **Livestock Production Science**, v. 43, p. 97–110, 1995.
- DOREAU, M., CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, suppl 1, p.15-35, 1997.
- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LANNA, D.P.D. et al. Consumo, produção e composição do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e diferentes fontes de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1,p.211-218, 2006.
- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LEÃO, M.I. et al. Efeito da Combinação de Óleo de Soja e Monensina na Dieta sobre o Consumo de Matéria Seca e a Digestão em Vacas Lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.297-308, 2005.
- ELLIOTT, J.P. et al. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.775-789, 1993.
- FERNANDES, F.D. et al. Composição química de sementes de dois genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) cultivados nos cerrados do Distrito Federal. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Forragicultura, 35, 1998. **Anais...Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 1998, p. 602-604.

- FIEVEZ V.; VLAEMINCK, B.; DHANOA, M. S. et al. Use of principal components analysis to investigate the origin of heptadecenoic acid and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p 1017-1053, 2003.
- FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E.R.; REEDS, P.J. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v.109, n.1, p.7-12, 1987.
- GAGLIOSTRO, G.A.; CHILLIARD, Y. Utilizacion de lípidos protegidos en la nutrición de la vaca lechera. I. Efectos sobre la producción y la composición de la leche y sobre la ingestión de materia seca y energía. **Revista Argentina de Producción Animal**, v.12, n.1, p.1-15, 1992.
- GARNSWORTHY, P.C. **Fat in dairy cow diets**. In:Recent Developments in Ruminant Nutrition 4, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p, 2002.
- GRIINARI, M.; HISSA, K.; RYHANEN, E.L. Dietary sunflower oil increases conjugated linoleic acid concentration in beef. **Journal of Animal Science**. v. 78, n.1, p. 276, 2000.
- GRUMMER RR, CARROLL DJ. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3838-3852, 1991.
- HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis**. (s.l.): Institute of Food Agricultural Sciences and University of Florida, 2000. 41p.
- HARA, A., and N.S. RADIN. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**. v.90, p.420-426, 1978.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.
- IDF – INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Whole milk. Determination of milk fat, protein and lactose content Guide for the operation of mid-infra-red instruments**. Bruxelles: 1996. 12p. (IDF Standard 141 B).
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- JENKINS, T.C.; JENNY, B.F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2316-2324, 1989.
- JOHNSON, M.M.; PETERS, J.P. Technical Note: An improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.753-756, 1993.
- JUTZELER VAN WIJLEN, R.P; COLOMBANI, P.C. Grass-based ruminant production methods and 38 human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of 39 conjugated linoleic acids. **International Dairy Journal** 20(7): 433-448. 2010.
- KAY, J.K.; MACKLE, T.R.; AULDIST, M.J.; THOMSON, N.A.; BAUMAN, D.E. Endogenous synthesis of cis-9 trans-11 CLA in dairy cows fed fresh pasture. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.369-378, 2004.
- KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E.; BAUMAN, D.E. dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.128, p.881-885, 1998.

- KEPLER, C.R.; TOVE, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids; III: Purification and properties of a linoleate 12-cis, 11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, p.5685-5692, 1967.
- KEPLER, C.R.; TUCKER, W.P.; TOVE, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids; IV: Substrate specificity and inhibition of linoleate 12-cis, 11-trans-isomerase from *Butyrivibrio Fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v.245, p.3612-3620, 1970.
- KRAMER, J.K.G.; V. FELLNER, M.E.R. Dugan, F.D. Sauer, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, 32: 1219-1228.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.
- LOCK, A. L., and P. C. GARNSWORTHY. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 -desaturase activity in dairy cows. **Livestock Production Science** 79:47-59.
- LOOR, J.J., DOREAU, M., CHARDIGNY, J.M., OLLIER, A., SEBEDIO, J.L., CHILLIARD, Y., 2005. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. **Anim. Feed Sci. Tech.** 199, 227-246.
- LUCAS, H.L. Extra-period latin-square change-over designs. **Journal of Dairy Science**. V.40, p.225-239, 1957.
- MCGUIRE, M. K., M. A. MCGUIRE, K. RITZENTHALER, and T. D. SHULTZ.1999. Dietary sources and intakes of conjugated linoleic acid intake in humans. In: M.P.Yurawecz, M. M. Mossoba, M. W.Pariza, and G. J. Nelson (ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. vol. 1. pp 369-377. AOCS Press, Champaign, IL.
- MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1992. p.188-219.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240,2002.
- MERTENS, D.R., LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, 1997. p.524-632.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. Ed.National Academic Press. Washington, D.C.: 2001. 381p.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, n.2, p.499-503, 1979.
- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors affecting milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1753-1771, 1993.

- PETERSON, D. G.; BAUMGARD, L. H.; BAUMAN, D. E. Short communication: Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.1764-1766, 2002.
- PIPEROVA, L. S., B. B. TETER, I. BRUCKENTAL, J. SAMPUGNA, S. E. MILLS, M. P. YURAWECZ, J. FRITSCHKE, K. KU, R. A. ERDMAN. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. **Journal of Nutrition**. 130, p.2568–2574, 2000.
- PRESTON, T.R. Nutritional limitations associated with the feeding of tropical forages. **Journal Animal Science**, v.54, n.4, p.877-883, 1982.
- PRESTON, T.R.; LENG, R.A. La caña de azúcar como alimento para los bovinos. **Revista Mundial de Zootecnia**, n.27, p.7-12, 1978.
- RIBEIRO, C. G.S.; GAMA, M.A.S.; LOPES, F.C.F. et al. Desempenho e composição do leite de vacas mestiças recebendo dietas baseadas em forragem tropical suplementadas com diferentes níveis de óleo de soja. In: REUNIÃO ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 20, 2007, Cuzco, **Anais...Cuzco: ALPA**, 2007. 1 Cd.
- RIBEIRO, L.R. Girassol: opção de cultivo para a produção de óleo comestível. In: SIMPÓSIO AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 1998, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: Embrapa-CNPAT, p.58-62, 1998.
- ROACH, J.A.G. MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P.; KRAMER, J.K.G. 2002. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chemical Acta**, v.465, p.207-226.
- SANTOS, J.E.P. **Distúrbios metabólicos** In: Nutrição de Ruminantes, Telma Teresinha Berchielli, Alexandra Vaz Pires, Simone Gisele de Oliveira (Ed.) – Jaboticabal:Funep, 583p., 2006.
- SAS INSTITUTE. SAS / STAT user's guide version 8.0. Cary, 2002. 291 p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 1.reimpressão. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- SILVA, M. M. C.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H.; RODRIGUES, C. A. F.; SARMENTO, J. L. R.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, S. P. Suplementação de lipídios em dietas para cabras em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 257-267, 2007.
- SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2463-2472, 1992.
- SMITH, N.E., W.L. DUNKLEY, and A.A. FRANKE. 1978. Effects of feeding protected tallow to dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**. 61:747.
- SNIFFEN, C.J., O'CONNOR J.D., VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- SUKHIJA, P. S., and D. L. PALMQUIST. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 36:1202–1206.
- VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.D.F. Recentes avanços em proteína na nutrição de vacas leiteiras. In: II SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO. Lavras. **Anais...**,p. 229-247, 2001.

- VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.12, p.2686-2696, 1999.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. Ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v.114, n.3, p.243-248, 1990.
- VLAEMINCK, B.V.; FIEVEZ, A.R.J.; CABRITA, A.J.M. et al. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.389-417, 2006.
- WALDO, D.R. Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.617-631, 1986.
- WEISS, W.P., 1999. Energy prediction equations for ruminant feeds. **Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**. Ithaca, New York. pp. 176-185.

Metabolismo de lipídeos no rúmen de vacas em lactação alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar

RESUMO – O objetivo desse trabalho foi avaliar dietas contendo cana-de-açúcar e óleo de girassol na alimentação de vacas leiteiras. O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas quatro vacas Holandês x Gir, multíparas, com produção média de 15 ± 5 kg de leite/dia, peso corporal médio de 500 ± 39 kg, distribuídas em quadrado latino 4 x 4, balanceado para efeito residual. Foram utilizadas quatro dietas (tratamentos) constituídas de cana-de-açúcar e quatro níveis de óleo de girassol (OG): 0, 1,5; 3,0 e 4,5% na base da MS, com relação volumoso:concentrado de 60:40. Cada um dos quatro períodos experimentais teve duração de 19 dias, sendo os dez primeiros de adaptação e os demais para as coletas de dados. Todas as dietas foram formuladas para serem isoproteicas, com 14,5% de proteína bruta, na base da MS. As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (6:00 h e 14:00 h), e amostras de leite foram obtidas diariamente do 11º ao 19º dia para determinação dos teores de lactose, gordura, nitrogênio total, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, perfil de ácidos graxos e concentrações de ureia e alantoína. A produção de matéria seca (MS) fecal e o fluxo de MS no omaso foi obtido com a fibra em detergente neutro indigestível, sendo as amostras coletadas durante seis dias. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos diferentes níveis de inclusão de OG nas dietas sobre o consumo de matéria seca, produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura, ou teores de proteína e lactose do leite. Porém, houve efeito linear decrescente sobre os teores de gordura e de sólidos no leite ($P < 0,05$) e sobre a produção de gordura ($P < 0,05$). A suplementação com OG não alterou o fluxo omasal de MS, MO, PB e FDNcp. As vacas alimentadas com óleo de girassol apresentaram maiores quantidades de C18:1 *trans*-4, C18:1 *trans* 6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12, C18:1 *trans*-12 e C18:1 *trans*-13, assim como maiores quantidades de C18:1 *cis*-13 e C18:1 *trans*-16 no canal do omaso. Houve redução na produção de proteína microbiana, assim como aumento da concentração de colesterol total e HDL, com o aumento de OG nas dietas. Houve redução ($P < 0,05$) na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média, e aumento na concentração do CLA, assim como os ácidos graxos insaturados na gordura do leite, com o aumento da inclusão de OG. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos níveis de inclusão de OG nas dietas sobre os parâmetros de

degradação da matéria seca e da fibra em detergente neutro, assim como para pH, concentração de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis no rúmen. Conclui-se que a suplementação de OG em dietas à base de cana-de-açúcar diminui a concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média e proporciona aumento no teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o CLA, tornando o leite produzido ainda mais saudável ao consumo humano.

Palavras-chave: ácidos graxos, lipídeos, pH, *Saccharum officinarum*

Ruminal lipid metabolism and milk fatty acid profile of dairy cows fed sugarcane-based diets containing different levels of sunflower oil

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the effects of sugar cane-based diets containing different levels of sunflower oil (SFO) on ruminal lipid metabolism and milk fatty acid profile of dairy cows. Four multiparous Holstein x Gir cows days in milk and average milk production of 15 ± 5 kg/d) with cannulas in the rumen received four dietary treatments (levels of SFO inclusion, % of diet DM) in a 4 x 4 Latin Square design composed of 19-day experimental periods (10 days for adaptation and the last 9 days for data collection). The treatments were: 1) Control: diet containing no SFO; 2) SFO1: diet containing 1.5% of SO; 3) SFO2: diet containing 3.0% of SFO and 4) SFO3: diet containing 4.5% of SFO. Diets were isoproteic (14.5% CP) and fed once a day as total mixed rations (TMR) composed of sugarcane and a concentrate mixture (60:40, % of diet DM). Milk samples were collected from morning and afternoon milking (6:00 and 14:00 h, respectively) during the last 9 days of each experimental period and analyzed for total solids, fat, protein, lactose, urea and allantoin contents. Additionally, blood and milk samples were collected on the last day of each experimental period, frozen at -20°C and analyzed for plasma metabolites and fatty acid profile, respectively. The production of faecal dry matter was estimated from samples collected during six consecutive days using indigestible NDF as an internal indicator. As observed in the Experiment 2, there was no effect of dietary treatments on DM intake, milk production (corrected or not for 3.5% fat), milk protein and milk lactose content, whereas milk fat content and yield as well as

microbial protein production were linearly reduced as the level of SFO in the diet increased from 0 to 4.5%. Sunflower oil did not alter the flow of DM, OM, CP and NDFap. The cows fed sunflower oil had higher levels of C18:1 *trans*-4, C18:1 *trans* 6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12, C18:1 *trans*-12 and *trans*-13, as well as higher levels of C18:1 *cis*-13 and C18:1 *trans*-16 in the canal of the omasum. Concentrations of total cholesterol and HDL in blood increased as the level of sunflower oil increased in the diet. Dry matter and NDF digestibility, pH and concentrations of NH₃ and VFA in the rumen were unaffected by dietary treatments. The concentration of short and medium chain fatty acids in milk fat were linearly reduced as the level of SFO increased, whereas total unsaturated fatty acids and CLA in milk fat were increased.

Keywords: fatty acids, pH, lipids, *Saccharum officinarum*

INTRODUÇÃO

Um dos principais efeitos deletérios da inclusão de elevadas concentrações de lipídeos em dietas de ruminantes é a redução na digestão ruminal da fibra. Desse modo, as quantidades e as proporções de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen podem ser negativamente alteradas, especialmente a relação acetato: propionato (Van Soest, 1994), promovendo a diminuição das produções de leite e de gordura no leite. Essas respostas, no entanto, não devem ser generalizadas, pois estão intimamente relacionadas à forma de inclusão dos lipídios nas dietas, ao grau de sua insaturação e ao comprimento da cadeia carbônica. Considerando que a síntese ruminal e a passagem de CLA para o duodeno é função da concentração de lipídeos poli-insaturados e das alterações ocorridas no ambiente ruminal devido às manipulações dietéticas, a suplementação com lipídeos é alternativa viável para aumentar a produção de CLA no rúmen e sua concentração nos tecidos e leite dos ruminantes.

A concentração de CLA no leite reflete a quantidade a qual é disponível para absorção no intestino delgado. Desta forma, a manipulação dietética que vise aumentar a sua produção ruminal, provavelmente refletirá em maiores níveis no leite e nos tecidos (Bessa et al., 2000). O aumento da ingestão de ácido linoleico é o fator primordial para o

aumento na produção de CLA. Portanto, a utilização de fontes lipídicas com maior concentração deste ácido graxo, tais como o óleo de girassol, provavelmente resultará em melhor resposta.

A manipulação dietética para elevar as concentrações dos ácidos graxos insaturados na gordura do leite pode influenciar nas rotas metabólicas de síntese de gordura, resultando em depressão do teor de gordura no leite. A redução no teor de gordura pode trazer prejuízos econômicos, sendo essa responsável por muitas propriedades físicas, características organolépticas de qualidade do leite e seus derivados, e também por fazer parte do sistema de pagamento em muitos países.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de óleo de girassol na dieta de vacas Holandês x Gir sobre o desempenho produtivo, consumo e dinâmica de nutrientes, perfil de ácidos graxos no leite, parâmetros sanguíneos e ruminais, além da síntese de proteína microbiana.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado entre julho a dezembro de 2009 no Campo Experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco (MG), na Zona da Mata de Minas Gerais, à latitude 21° 33' 22" sul e longitude 43° 06' 15" oeste, estando à altitude de 426 metros. O clima na região é do tipo Cwb, segundo o sistema Köppen, ou seja, mesotérmico com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos. A precipitação média anual é de 1.600 mm, aproximadamente, apresentando período mais seco de maio a outubro, com precipitação média de 350 mm, e um período mais chuvoso, de novembro a abril, com precipitação média de 1.250 mm. A temperatura média anual é de 22,5°C e a média dos meses mais quentes (dezembro a março) de 25°C e a média dos meses mais frios (junho a agosto) de 19,5°C. A umidade relativa média do ar é em torno de 77%.

Foram utilizadas quatro vacas Holandês x Gir, múltíparas, fistuladas no rúmen, com 107 ± 10 dias de lactação, e produção média diária de 15±5 kg de leite e peso corporal médio de 500±39 kg. Os animais foram distribuídos em quadrado latino 4 x 4, balanceado para efeito residual, de acordo com Lucas (1957). A proporção dos ingredientes utilizados

nas dietas experimentais e no concentrado e a composição nutricional dos ingredientes são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1– Proporção dos ingredientes no concentrado e nas dietas de vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ingredientes	Níveis de OG			
	0,0	1,5	3,0	4,5
Concentrado				
Polpa cítrica	21,25	29,25	42,00	42,5
Fubá de milho	41,25	27,25	9,75	5,00
Farelo de soja	33,25	34,50	35,62	36,00
Óleo de girassol	0,00	3,75	7,50	11,25
Uréia + SA (9:1) ¹	2,63	2,63	2,63	2,63
Suplemento mineral-vitamínico ²	2,40	2,45	2,58	2,65
Dieta				
Cana-de-açúcar	60,00	60,00	60,00	60,00
Polpa cítrica	8,50	11,80	16,80	17,00
Fubá de milho	16,50	10,90	3,90	2,00
Farelo de soja	13,30	13,80	14,25	14,40
Óleo de girassol	0,00	1,50	3,00	4,50
Uréia + SA (9:1) ¹	1,05	1,05	1,05	1,05
Suplemento mineral-vitamínico ²	0,96	0,98	1,03	1,06

¹ Sulfato de amônio; ² Mistura mineral comercial

Tabela 2 – Composição nutricional dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

Itens	Farelo de Soja	Polpa Cítrica	Fubá de Milho	Cana-de-açúcar
Matéria Seca (%)	88,23	88,67	87,69	30,23
Matéria Orgânica ¹	92,12	92,16	98,23	94,77
Proteína Bruta ¹	51,18	5,77	8,88	2,02
Nitrogênio não-proteico ²	18,92	19,56	18,89	75,34
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ²	4,24	42,34	9,27	24,67
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ²	2,66	12,28	3,20	14,64
Extrato etéreo ¹	1,88	1,97	4,02	1,09
Fibra em detergente ácido ¹	11,66	22,18	5,18	35,89
Fibra em detergente neutro corrigida ¹	12,57	18,65	9,63	42,89
Carboidratos não-fibrosos corrigido ¹	26,49	64,77	79,15	48,77
Lignina ¹	0,27	6,02	0,59	5,17
Ca (%)	0,22	1,37	0,03	0,13
P (%)	0,56	0,13	0,24	0,09
Digestibilidade <i>in vitro</i> daMS(%)	89,23	89,88	88,23	54,66

¹- % da MS; ²- % do N total

O experimento foi constituído de quatro períodos com duração de 19 dias cada, sendo os dez primeiros de adaptação, e os demais para avaliar o consumo e a digestibilidade aparente total e parcial dos nutrientes, a produção de leite e sua composição, incluindo o perfil de ácidos graxos, os níveis séricos de ácidos graxos não esterificados, colesterol total, triglicerídeos e HDL, glicose e a concentração de nitrogênio ureico, os parâmetros ruminais (pH, amônia e ácidos graxos voláteis), a síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais, o balanço de nitrogênio e a degradabilidade da cana-de-açúcar nas diferentes dietas experimentais.

Os animais foram alimentados com quatro dietas (tratamentos) à base de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivar RB 739735, com 0, 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, na base da MS, sendo usada a relação volumoso:concentrado de 60:40. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas, de forma a atender às exigências nutricionais de uma vaca com 500 kg de peso corporal, produzindo diariamente 17 kg de leite e com ganho de peso diário de 0,30 kg/dia, segundo o NRC (2001). A cana-de-açúcar foi cortada, triturada e fornecida diariamente *in natura*. A cana-de-açúcar utilizada durante o experimento apresentou valor de grau brix médio de 18 ± 4 , mensurado por meio de refratômetro de campo, valor considerado por Brieger (1968) como mínimo para a cana-de-açúcar atingir sua maturidade. O óleo de girassol foi misturado semanalmente com os alimentos concentrados, de forma a minimizar a peroxidação lipídica. O teor médio dos nutrientes nas dietas é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Teores médios de nutrientes nas dietas, para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG			
	0,0	1,5	3,0	4,5
Matéria seca (%)	51,88	50,34	49,03	47,67
Matéria orgânica ¹	93,16	91,16	89,30	87,76
Proteína bruta ¹	12,93	12,87	12,77	12,69
Extrato etéreo ¹	1,73	3,08	4,41	5,84
Nitrogênio não-proteico ²	52,50	52,18	51,92	51,63
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ²	20,49	21,39	22,88	22,80
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ²	10,71	10,95	11,35	11,32
Fibra em detergente neutro corrigida cinzas e proteína ¹	30,58	30,72	31,03	30,91
Carboidratos não-fibrosos corrigidos cinzas e proteína ¹	49,89	46,45	43,06	40,29
Lignina ¹	3,75	3,91	4,17	4,18
Nutrientes digestíveis totais	73,52	74,86	75,16	79,60

¹ % da MS; ² - % do N total

Os animais foram alojados em baias coletivas, tipo *free stall*, provido de comedouro e bebedouro. A alimentação foi oferecida *ad libitum* na forma de mistura completa, uma vez ao dia (08:00 h) utilizando vagão misturador/distribuidor Data Ranger® (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA). O consumo individual de matéria seca (MS) foi determinado diariamente usando cochos com portões eletrônicos do tipo *calan-gates* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA). Diariamente, foram feitas pesagens das quantidades fornecidas e das sobras de cada tratamento, permitindo-se 10% de sobras em relação ao oferecido. Ao final de cada período de coleta, elaborou-se amostra composta por animal, sendo essas armazenadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C para posterior análise bromatológica e determinação do perfil de ácidos graxos. O perfil de ácidos graxos da cana-de-açúcar e dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais é apresentado Tabela 4.

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos nos ingredientes e nas dietas experimentais

Ácidos graxos	Óleo de girassol	Farelo de soja	Fubá de milho	Polpa cítrica	Cana-de-açúcar	Níveis de OG			
						0,0	1,5	3,0	4,5
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81	0,57	0,57	0,56	0,54
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,38	1,16	0,72	0,72	0,71	0,71
C14:0	0,05	0,11	0,00	0,57	0,94	0,62	0,61	0,61	0,60
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,09	0,53	0,33	0,32	0,32	0,32
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,20	0,20	0,20	0,20
C16:0	7,54	18,86	17,07	29,80	26,49	22,63	20,59	19,91	19,53
C16:1 <i>trans</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	2,41	1,45	1,64	1,45	1,45
C16:1 <i>cis</i>	0,09	0,04	0,08	0,51	1,10	0,74	0,71	0,71	0,71
C17:0	0,00	0,14	0,00	0,32	0,44	0,32	0,30	0,30	0,30
C17:1	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	3,56	5,14	3,95	5,95	4,40	3,96	4,03	4,09	4,03
C18:1 <i>cis-9</i>	22,07	17,21	35,69	20,30	12,68	18,50	17,54	16,95	16,71
C18:1 isômeros	0,00	1,70	0,95	3,01	0,99	1,16	1,09	1,09	1,07
C18:2 <i>cis cis</i>	59,94	49,93	40,03	31,73	30,66	36,56	39,86	41,40	42,20
C20:0	0,26	0,32	0,63	0,49	1,78	1,26	1,21	1,19	1,18
C18:3	1,36	5,61	0,94	5,47	10,71	7,89	7,39	7,35	7,31
C20:1	0,18	0,00	0,08	0,00	1,12	0,77	0,75	0,73	0,74
C22:0	0,58	0,50	0,22	0,52	1,10	0,77	0,85	0,88	0,89
C24:0	0,22	0,30	0,36	0,67	2,34	1,55	1,55	1,53	1,51
C24:1	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00

Ácidos graxos expressos g/100 g de AG totais

As amostras de fezes foram coletadas a intervalos de 26 horas a partir do 11º até o 16º dia do período experimental, tendo início às 8:00 h e término às 18:00 h, respectivamente. Após o término do experimento, as amostras de alimentos, fezes e sobras foram descongeladas, pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55º C, durante 72 a 96 horas e, posteriormente, moídas em moinho de facas dotado de peneira com perfurações de 1 mm.

As amostras de digesta omasal foram obtidas no primeiro dia de cada fase de coletas antes do arraçoamento matinal (0 hora) e 12 horas após o mesmo; no segundo dia, às 4 e 16 horas após o arraçoamento e no terceiro e último dia, às 8 e 20 horas, totalizando 24 horas de coleta da digesta com intervalo de quatro horas. Na coleta da digesta omasal foi utilizado um conjunto de dispositivos que constituíram de um kitassato, um tubo coletor e uma bomba de vácuo, conforme descrito por Leão (2002), sendo amostrados 400 mL de

digesta que foram congelados (-20°C) logo após a coleta até o processamento. Após o descongelamento, foi feita amostra composta por animal por período experimental. O fluxo de matéria seca no omaso foi obtido dividindo-se o consumo de FDNi pela sua concentração na digesta omasal.

Para a estimação dos coeficientes de digestibilidade aparente foi utilizada a fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno, obtida após 264 horas (Casali et al., 2008) de incubação ruminal *in situ* dos alimentos fornecidos, sobras e fezes, utilizando sacos Ankon® (filter bag F57), segundo adaptação Cochran et al. (1986). As amostras (20 mg MS/cm²) foram incubadas em triplicata por 264 horas no rúmen de duas vacas da raça Holandês recebendo dieta à base de silagem de milho e concentrado. Após este período, o material remanescente da incubação foi submetido à extração com detergente neutro (Mertens, 2002) para quantificação dos teores de FDNi. Os valores de excreção fecal foram obtidos por intermédio da relação entre consumo e concentração fecal de FDNi.

As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (6:00 h e 14:00 h), fazendo-se o registro da produção de leite durante todo o período de coleta de cada período experimental. Por meio de dispositivo acoplado à ordenhadeira, foram coletadas amostras diárias de leite de, aproximadamente, 300 mL, nas ordenhas da manhã e da tarde, fazendo-se amostras compostas referentes a cada dia de acordo com a produção de leite obtida em cada período. Foram retiradas de cada amostra composta três alíquotas: a primeira (50 mL) foi acondicionada em fracos plásticos com conservante (Bronopol®), mantida entre 2 e 6°C, e encaminhada para o Laboratório de Qualidade de Leite da Embrapa Gado de Leite, para determinação dos teores de lactose, gordura, nitrogênio total, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite, segundo a técnica descrita pelo International Dairy Federation (1996); a segunda alíquota foi desproteïnizada com ácido tricloroacético (10 mL de leite misturados com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%), filtrada em papel-filtro, para posterior determinação do teor de nitrogênio não-proteico, sendo o restante armazenado a -20°C, para posterior análise de alantoína e ureia; a terceira alíquota (100 mL) foi armazenada (-20°C) para análise do perfil de ácidos graxos.

A produção de leite corrigida (PLC) para 3,5 % de gordura, foi calculada segundo Sklan et al. (1992), pela seguinte fórmula: $PLC = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{ gordura do leite}) \times$

produção de leite em kg/dia. No início de cada período do quadrado latino, foram feitas pesagens individuais dos animais para avaliar a variação de peso. Os pesos dos animais corresponderam às médias de duas pesagens, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas.

Foram coletadas amostras de líquido ruminal nos tempos imediatamente antes (tempo 0) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 e 24 horas após o fornecimento do trato diário no 15º dia do período experimental, para mensuração do pH, das concentrações de N-NH₃ e de ácidos graxos voláteis. Amostras de 50 mL de líquido ruminal foram retiradas para leitura imediata do pH, utilizando-se potenciômetro. Após a leitura, foi separada alíquota de 40 mL de amostra que foi conservada com 1 mL de H₂SO₄ (1:1) e armazenadas para posterior análise quanto ao teor de amônia, segundo Chaney & Marbach (1962). Para cada horário de coleta, alíquotas de 20 mL de fluido ruminal foram fixadas em formalina 18,5% (v/v) (Dehority, 1984) e enviados ao Laboratório de Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora para análise dos gêneros de protozoários, segundo Ogimoto & Imai (1981) e quantificados em câmara Sedgewick–Rafter, segundo Dehority (1984) com modificações propostas por D’Agosto & Carneiro (1999). Para a determinação das concentrações dos ácidos graxos voláteis foram colhidos 5 mL de líquido ruminal nos mesmos horários empregados para mensuração do pH ruminal e também durante o primeiro dia de cada período experimental, para monitorar as alterações do perfil de ácidos graxos voláteis no rúmen após a mudança de tratamento. As amostras foram armazenadas em frascos contendo 1 mL de solução de ácido metafosfórico (250 g/L) e armazenadas para posteriores análises. As concentrações de cada ácidos graxos voláteis (ácido acético, propiônico e butírico) foram determinadas por meio da técnica de cromatografia gasosa.

Amostras de sangue de todas as vacas foram coletadas no 18º dia por punção da veia coccígea, utilizando tubos de ensaio com anticoagulante (EDTA). Imediatamente, foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos, sendo então retiradas amostras de plasma e acondicionadas em recipientes de vidro e armazenadas a -15°C, para posteriores análises de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), glicose, colesterol, triglicérides, HDL e concentração de nitrogênio ureico. Para estimar o N-ureico do plasma sanguíneo, do leite e da urina, foi utilizado o fator de 0,466 que corresponde ao teor de N na ureia. Para a determinação de AGNE, foi utilizado *kit* comercial (Wako), adotando-se a técnica de

otimização de reagente proposta por Jonhson & Peters (1993). Os teores plasmáticos de glicose, colesterol, triglicérides e HDL foram determinados utilizando-se *kits* comerciais.

Amostras *spot* de urina de todas as vacas foram obtidas no 19º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção espontânea. Da urina coletada, após a homogeneização e filtragem, foram obtidas alíquotas de 10 mL que foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico 0,036 N, conforme descrito em Valadares et al. (1999), que foram acondicionados em recipientes plásticos, e congelados para posteriores análises de ureia, nitrogênio total, creatinina, ácido úrico, alantoína. O volume urinário total diário foi estimado, dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina, segundo Valadares Filho & Valadares (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/kg de peso corporal (PC) de creatinina (Chizzotti et al., 2006).

O perfil de ácidos graxos do leite foi determinado utilizando-se cromatógrafo de fase gasosa modelo 6890N (Agilent Technologies Inc., EUA) equipado com coluna CP-SIL 88 FAME 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm (Varian Inc., EUA) e detector de ionização de chama com condições de operação descritas por Cruz-Hernandez et al. (2007), e *software* Agilent ChemStation (Agilent Technologies Inc., EUA). Para a análise do perfil de ácidos graxos das amostras de omaso, os lipídeos foram extraídos das amostras liofilizadas, seguindo o protocolo descrito por Shingfield et al. (2003) e determinados igualmente por cromatografia gasosa. A fração lipídica das amostras foi previamente extraída em solução de hexano-isopropanol (3:2), conforme descrito por Hara & Radin (1978). Em seguida, as frações lipídicas foram metiladas em solução básica de metóxido de sódio (Christie, 1982), antes da injeção no cromatógrafo. Este procedimento tem sido preferencialmente utilizado, pois catálises ácidas podem resultar na isomerização dos CLAs de configuração *cis-trans* ou *trans-cis* para configurações do tipo *trans-trans* (Kramer et al., 1997). As condições da corrida (fluxo de gás, gradiente de temperatura do forno, razão de “split”, etc.) foram aquelas descritas por Destillats et al. (2007). Os principais ácidos graxos das amostras foram identificados por comparação com os tempos de retenção observados em padrões apropriados (Sigma Diagnostics, PA); isômeros menores de C18:1 *trans/cis* e de CLA foram identificados com base em trabalhos publicados na literatura (Roach et al., 2002; Destillats et al., 2007). As amostras de forragem e dos ingredientes, destinadas à análise do

perfil de ácidos graxos, foram liofilizadas e, posteriormente, moídas em moinho de facas dotado de peneiras com abertura de malhas de 1 mm, antes das etapas de extração e metilação. A extração e metilação dos ácidos graxos das amostras de forragem, concentrados e óleo de girassol foram realizadas em uma só etapa (“one step”), conforme descrito por Sukhija & Palmquist (1988).

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), compostos nitrogenados totais (NT), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), extrato etéreo (EE) e lignina (LIG) seguiram as especificações descritas em Silva & Queiróz (2002). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram estimados segundo recomendações de Mertens (2002). As correções dos teores de cinzas e proteína contidos na FDN e na FDA foram conduzidas conforme recomendações de Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente. A determinação de nitrogênio não proteico (NNP) dos alimentos foi realizada segundo Licitra et al. (1996).

Os teores de carboidratos não-fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (CNF_{cp}) foram calculados conforme Detmann & Valadares Filho (2010), sendo: $CNF_{cp} = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da ureia} + \%ureia) + \%FDN_{cp} + \%EE + \%Cinzas]$. Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados com adaptações ao descrito por Weiss (1999), pela seguinte equação: $NDT (\%) = PBD + FDN_{cpD} + CNF_{cpD} + 2,25EED$, em que: PBD= proteína bruta digestível; FDN_{cpD} = fibra em detergente neutro digestível; CNF_{cpD} = carboidratos não-fibrosos digestíveis; e EED= extrato etéreo digestível.

O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N-total) e o total daquele excretado nas fezes (N-fezes), na urina (N-urina) e secretado no leite (N-leite). A determinação do nitrogênio total nas fezes e na urina foi feita segundo técnica descrita em Silva & Queiroz (2002).

As análises de alantoína na urina e no leite foram feitas pelo método colorimétrico, segundo Fujihara et al. (1987), descrito por Chen & Gomes (1992). As determinações de creatinina, ácido úrico e ureia foram realizadas por meio de *kits* comerciais (Labtest). A excreção total de derivados de purina (DP) foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia. As purinas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas a partir da

excreção de DP (Y, mmol/dia), por meio da equação $Y = 0,85X + 0,385 PC^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e 0,385 $PC^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas (Verbic et al., 1990).

A síntese ruminal de compostos nitrogenados (N_{mic} , gN/dia) foi calculada em função das purinas microbianas absorvidas (PA, mmol/dia), utilizando-se a equação $N_{mic} = (70 * PA) / (0,83 * 0,116 * 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 a digestibilidade intestinal das purinas microbianas e 0,116 a relação N-purina:N-total nas bactérias (Chen & Gomes, 1992).

Para determinar a degradabilidade da cana-de-açúcar, amostras de 5 g da cana-de-açúcar pré-secadas em estufa regulada para 55°C, foram moídas em moinho tipo *Willey* com peneiras de 2 mm e colocadas em sacos de náilon de 10 x 20 cm com porosidade de 50 μ para a determinação das degradabilidades ruminais da matéria seca (MS) e da fibra detergente neutro (FDN). Os tempos de incubação ruminal da cana-de-açúcar foram de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 144 h. Utilizou-se esquema de incubação sequencial e remoção simultânea. As amostras foram incubadas em duplicata no rúmen de uma vaca em lactação, com 550 kg de peso corporal e produção de leite próxima de 20 kg/dia, por intermédio da fístula ruminal. Decorrido o tempo de incubação, os sacos foram lavados em água e levados à estufa a 55°C por 72 horas, sendo, posteriormente, avaliados os teores de MS e FDN dos resíduos da incubação. Utilizou-se a técnica *in situ* descrita por Mehrez & Orskov (1977), para se determinar as degradabilidades potencial e efetiva da matéria seca. Os parâmetros da dinâmica de degradação da FDN foram estimados utilizando o modelo descrito por Mertens & Loften et al. (1980): $Y_t = b * e^{(-kd \cdot (t-L))} + I$; em que: Y_t = resíduo indegradável no tempo “t”; b = fração potencialmente degradável da FDN; kd = taxa de degradação de b; e t = variável independente tempo; L = tempo de latência (horas); I = fração indegradável da FDN, sendo utilizado o valor do resíduo após 144 horas de incubação. A degradabilidade ruminal efetiva (DE) do componente nutritivo analisado foi calculada segundo o modelo matemático proposto por Orskov & McDonald (1979): $DE = a + [(b * c) / (c + kp)]$, em que kp é a taxa de passagem de sólidos pelo rúmen, definida aqui como sendo de 2,0 e 5,0%/h.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2002) adotando-se o nível de 5% de

probabilidade para o erro tipo I. As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + (P/Q)_{ik} + (V/Q)_{il} + Q \times T_{ij} + e_{ijkl}, \text{ sendo:}$$

Y_{ijkl} = observação na vaca 1, no período k, submetida ao tratamento j, no quadrado latino i;

μ = constante geral;

Q_i = efeito do quadrado latino i, sendo $i = 1, 2, 3$;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) da inclusão de óleo de girassol sobre os consumos dos nutrientes, exceto para o consumo de EE que apresentou efeito linear crescente (Tabela 5). Os dados do presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Zinn et al. (2000), que trabalhando com diferentes níveis e fontes lipídicas, concluíram que o uso de 6% de lipídios não alterou o CMS.

Tabela 5 - Consumos diários de nutrientes para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)		
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q	
	kg/dia							
Matéria seca	14,6	15,5	16,1	14,4	0,703	ns ²	ns	
Matéria orgânica	14,0	14,8	15,3	13,8	0,656	ns	ns	
Proteína bruta	1,85	1,96	2,00	1,80	0,091	ns	ns	
Extrato etéreo	0,26	0,51	0,73	0,88	0,039	<0,001	ns	
FDN corrigida para cinzas e proteína	5,0	5,42	5,79	5,10	0,289	ns	ns	
FDN indigestível	2,28	2,45	2,56	2,24	0,154	ns	ns	
CNF corrigidos para cinzas e proteína	7,2	7,23	7,12	6,26	0,282	ns	ns	
Nutrientes digestíveis totais	10,8	11,6	12,1	11,4	0,432	ns	ns	
	g/kg do peso corporal							
Matéria seca	30,3	32,3	34,2	30,4	0,164	ns	ns	
FDN corrigida cinzas e proteína	10,4	11,3	12,0	10,8	0,060	ns	ns	
FDN indigestível	4,8	5,1	5,3	4,7	0,031	ns	ns	
	Equações de regressão							r ²
Consumo de EE (kg/vaca/dia)	$\hat{y} = 0,281 + 0,139 \times X$							0,96
Consumo de EE (% do peso corporal)	$\hat{y} = 0,056 + 0,030 \times X$							0,97

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P > 0,05$); r² = coeficiente de determinação

O consumo e a digestibilidade da FDN_{cp}, mostrados nas Tabelas 5 e 6, não diferiram entre as dietas, o que sugere que aquelas com a inclusão de OG mantiveram o equilíbrio dos micro-organismos ruminais, ou seja, apresentaram quantidade de ácidos graxos insaturados condizentes com a capacidade de hidrogenação dos micro-organismos, sobretudo aos celulolíticos, no rúmen. Contudo, o consumo de FDN_{cp} foi próximo ao valor de 1,2% de FDN em relação ao peso corporal preconizados por Mertens (1994) para que vacas lactantes apresentem consumo ótimo de matéria seca.

A inclusão de óleo de girassol na dieta proporcionou maior consumo de EE ($P < 0,05$) por parte dos animais suplementados com essa fonte lipídica, o que se explica pela diferença no teor de EE das quatro dietas experimentais (Tabela 3) e por não ter havido diferença significativa no CMS (Tabela 5). De modo geral, o consumo de EE caracterizou a resposta dos animais aos teores de lipídios disponíveis na dieta.

Não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) nos coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, FDN_{cp}, e CNF_{cp} entre as dietas experimentais (Tabela 6). Conforme Van Soest (1994), a digestibilidade e utilização dos nutrientes são uma descrição qualitativa do consumo dos alimentos. Neste contexto, pode-se observar que as digestibilidades aparentes dos nutrientes não variaram em função da inclusão dos níveis de óleo de girassol, assim como também os consumos de MS (em kg/dia e g/kg) (Tabela 5).

Bateman & Jenkins (1998) também não encontraram efeitos da inclusão de até 8% de óleo de soja sobre as digestibilidades aparentes da MS, MO, PB e FDN. Os autores concluíram que grandes quantidades de ácidos graxos podem ser suplementadas sem efeito deletério sobre as digestibilidades, mesmo não sendo lipídeos protegidos. Esses dados corroboram com diversos dados encontrados na literatura (Eifert et al., 2005; Leite, 2006 e Silva et al., 2007).

Já a digestibilidade do extrato etéreo aumentou linearmente ($P < 0,05$) com o incremento nos níveis de óleo de girassol nas dietas (Tabela 6). Também Silva et al. (2007) observaram maior coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo para dietas com óleo de soja, em comparação ao grão de soja, para cabras em lactação. Possivelmente, com o aumento do consumo de EE houve diluição das perdas endógenas, o que explica a maior digestibilidade.

A porcentagem de NDT aumentou ($P < 0,1$) com a inclusão de óleo de girassol às dietas experimentais. Esse fato pode ser explicado em virtude de parte dos CNF terem sido substituídos pelo extrato etéreo, fração 2,25 vezes mais energética. Entretanto, o consumo de NDT (kg/dia) não diferiu ($P > 0,05$) entre as dietas.

Tabela 6 – Digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas experimentais

Itens	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
Matéria seca	71,3	70,2	69,4	71,4	0,859	ns	ns
Matéria orgânica	72,5	72,2	71,2	73,2	0,853	ns	ns
Proteína bruta	69,0	68,1	69,7	70,6	1,386	ns	ns
Extrato etéreo	86,8	95,3	93,7	97,2	1,747	<0,01	ns
FDN corrigida para cinzas e proteína	42,5	42,9	42,9	46,6	1,340	ns	ns
Carboidratos não-fibrosos corrigidos	97,1	97,5	96,6	97,2	0,432	ns	ns
Teor de Nutrientes digestíveis totais	73,5	74,8	75,2	79,6	0,968	ns	ns
Equações de regressão						r^2	
Digestibilidade do extrato etéreo	$\hat{y} = 88,755 + 1,988 * X$					0,80	

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P > 0,05$); r^2 = coeficiente de determinação

Os valores médios de digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes são apresentados na Tabela 7. As digestibilidades total, ruminal e intestinal da MS, MO, PB, FDNcp e CNFcp não foram afetadas ($P > 0,05$) pelos níveis de OG na dieta.

A digestibilidade intestinal da FDNcp apresentou valor médio de 3,76%, no tratamento controle e 2,57; 4,72 e 2,72% nos tratamentos com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 7). O baixo valor de digestibilidade intestinal da FDNcp já era esperado visto o local de maior digestão deste nutriente ser o rúmen. E, nesse compartimento a digestibilidade ruminal da FDNcp não foi afetada pela adição de OG, sendo a média de 46,85% para tratamento controle e 42,16; 40,39 e 46,16, respectivamente, para os demais.

Tabela 7 – Valores médios de digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Nutrientes	Níveis de OG				EPM ^a	Efeito (valor P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	O
Digestibilidade total (%)							
Matéria seca	71,34	70,22	69,39	71,42	0,781	ns ²	ns
Matéria orgânica	72,50	72,25	71,24	73,23	0,835	ns	ns
Proteína bruta	69,01	68,08	69,86	70,59	1,263	ns	ns
Extrato etéreo	86,80	95,25	93,66	97,25	0,685	<0,0001	ns
FDN corrigido cinzas e proteína	42,54	42,87	42,91	46,66	1,503	ns	ns
CNF corrigido cinzas e proteína	97,10	97,55	96,66	97,21	0,566	ns	ns
Digestibilidade ruminal (% do ingerido)							
Matéria seca	45,96	44,07	42,11	46,94	1,881	ns	ns
Matéria orgânica	53,33	53,32	51,30	55,02	1,805	ns	ns
Proteína bruta	0,94	6,25	-0,10	12,56	5,103	ns	ns
Extrato etéreo	0,58	-1,24	-3,10	-1,86	1,034	0,044	ns
FDN corrigido cinzas e proteína	42,65	42,16	40,39	46,16	2,788	ns	ns
CNF corrigido cinzas e proteína	78,33	79,72	79,82	84,76	2,289	ns	ns
Digestibilidade intestinal (% do ingerido)							
Matéria seca	27,52	28,16	29,28	26,17	1,745	ns	ns
Matéria orgânica	20,67	19,73	20,98	19,30	1,889	ns	ns
Proteína bruta	69,79	66,67	70,73	68,02	2,377	ns	ns
Extrato etéreo	90,16	93,73	94,73	97,42	0,663	<0,0001	ns
FDN corrigido cinzas e proteína	3,76	2,57	4,72	2,72	2,280	ns	ns
CNF corrigido cinzas e proteína	17,27	15,14	14,00	9,35	2,615	0,0599	ns
Equações de regressão							r ²
Digestibilidade total extrato etéreo			$\hat{y} = 90,596 + 1,488*X$			0,91	
Digestibilidade ruminal extrato etéreo			$\hat{y} = -0,025 - 0,612*X$			0,60	
Digestibilidade intestinal extrato etéreo			$\hat{y} = 90,594 + 1,518*X$			0,92	
Digestibilidade intestinal CNFcp			$\hat{y} = 17,671 - 1,659*X$			0,69	

^aEPM = Erro-padrão da média; ^bns = não-significativo (P>0,05)

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) nas digestibilidades total e intestinal do EE entre os tratamentos, apresentando médias de 90,22; 93,65; 94,56 e 97,55% para digestibilidade total e, 90,16; 93,73; 94,73 e 97,42% para digestibilidade intestinal, respectivamente. Houve efeito linear decrescente para digestibilidade ruminal do EE ($P < 0,05$) apresentando inclusive valores negativos entre os tratamentos com OG, valores esses de -1,24; -3,10 e -1,86% nos tratamentos com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 7). O OG é rico em ácidos graxos insaturados (Tabela 4), o que provavelmente contribuiu para o aumento no coeficiente de absorção, em razão da formação de monoglicerídios no intestino, que atuam como agentes emulsificantes, facilitando a formação de micelas. Isso justifica os maiores coeficientes de digestibilidade total do EE obtidos entre as dietas experimentais. Normalmente, a digestibilidade ruminal do EE é negativa, em razão da síntese lipídica (*síntese de novo*) microbiana a partir dos produtos da fermentação dos carboidratos, o que faz com que cheguem mais lipídeos no abomaso do que a quantidade ingerida do mesmo.

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos saturados no omaso de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito (valor de P)		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		L	Q		
	C4:0	1,13	0,75	0,71		0,96	0,233		
C6:0	1,10	0,83	0,76	0,94	0,116	ns	ns	-	-
C8:0	0,52	0,27	0,32	0,35	0,061	ns	0,044	$\hat{y} = 0,498 - 0,167*X + 0,030*X^2$	0,71
C10:0	1,40	0,68	0,81	0,85	0,1379	ns	0,033	$\hat{y} = 1,354 - 0,479*X + 0,083 *X^2$	0,83
C11:0	0,13	0,13	0,10	0,11	0,017	ns	ns	-	-
C12:0	8,54	7,13	5,56	6,65	0,986	ns	ns	-	-
C13:0	0,31	0,26	0,21	0,22	0,029	0,017	ns	$\hat{y} = 0,294 - 0,0206*X$	0,59
C14:0	5,23	2,82	3,24	3,18	0,665	ns	ns	-	-
C15:0	0,56	0,74	0,52	0,59	0,086	ns	ns	-	-
C16:0	19,53	14,62	14,99	15,10	1,310	ns	ns	-	-
C17:0	0,52	0,40	0,34	0,40	0,069	ns	ns	-	-
C18:0	23,94	31,64	29,71	28,60	2,697	ns	ns	-	-
C20:0	0,38	0,40	0,37	0,38	0,029	ns	ns	-	-
C22:0	0,19	0,36	0,38	0,35	0,034	0,021	0,017	$\hat{y} = 0,191 + 0,133*X - 0,022*X^2$	0,82
C24:0	0,27	0,23	0,22	0,40	0,079	ns	ns	-	-
∑AG saturados total ímpar	1,52	1,52	1,17	1,32	0,170	ns	ns	-	-
∑AG saturados cadeia curta total	4,15	2,53	2,60	3,09	0,389	ns	0,011	$\hat{y} = 4,089 - 1,262*X + 0,234*X^2$	0,75
∑AG saturados cadeia média total	34,82	26,09	24,97	26,24	2,627	0,043	0,054	$\hat{y} = 32,057 - 1,789 *X$	0,68
∑AG saturados cadeia longa total	24,69	32,63	30,69	29,75	2,715	ns	ns	-	-
∑AG saturados total	63,66	61,24	58,26	59,08	3,756	ns	ns	-	-

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos octadecenoicos *cis*, *trans* e conjugados no omaso de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C18:1 <i>trans</i> -4	0,02	0,13	0,16	0,14	0,028	0,027	0,069	$\hat{y} = 0,053 + 0,026 * X$	0,81
C18:1 <i>trans</i> -5	0,05	0,10	0,10	0,10	0,025	ns	ns	-	-
C18:1 <i>trans</i> 6-8	0,24	0,64	0,97	1,10	0,185	0,010	ns	$\hat{y} = 0,301 + 0,193 * X$	0,79
C18:1 <i>trans</i> -9	0,29	0,57	0,62	0,63	0,083	0,018	ns	$\hat{y} = 0,364 + 0,070 * X$	0,73
C18:1 <i>trans</i> -10	0,61	3,48	4,71	7,02	1,486	0,031	ns	$\hat{y} = 0,888 + 1,364 * X$	0,80
C18:1 <i>trans</i> -11	2,62	7,18	9,08	7,90	1,700	0,030	0,074	$\hat{y} = 4,032 + 1,128 * X$	0,75
C18:1 <i>trans</i> -12	0,39	0,80	1,07	1,02	0,139	0,003	0,066	$\hat{y} = 0,498 + 0,143 * X$	0,77
C18:1 <i>trans</i> -13 e <i>trans</i> -14	0,55	1,06	1,39	1,39	0,1789	0,004	ns	$\hat{y} = 0,671 + 0,188 * X$	0,77
C18:1 <i>cis</i> -9 + C18:1 <i>trans</i> -15	11,66	10,37	9,62	8,33	1,823	ns	ns	-	-
C18:1 <i>cis</i> -11	1,23	1,31	1,29	1,16	0,177	ns	ns	-	-
C18:1 <i>cis</i> -12	0,62	0,58	0,64	0,62	0,054	ns	ns	-	-
C18:1 <i>cis</i> -13	0,21	0,33	0,41	0,42	0,075	0,022	ns	$\hat{y} = 0,234 + 0,047 * X$	0,60
C18:1 <i>trans</i> -16	0,20	0,33	0,42	0,36	0,023	0,0078	0,0088	$\hat{y} = 0,192 + 0,134 * X - 0,02 * X^2$	0,92
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,09	0,08	0,06	0,03	0,026	ns	ns	-	-
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	2,49	2,34	2,24	1,91	0,399	ns	ns	-	-
Isômeros do C18:3 n-3	0,02	0,02	0,02	0,00	0,021	ns	ns	-	-
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,29	0,18	0,19	0,14	0,021	0,0078	ns	$\hat{y} = 0,263 - 0,028 * X$	0,90
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	1,17	1,59	1,24	1,14	0,102	ns	0,0079	$\hat{y} = - * X$	-
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,13	0,32	0,22	0,32	0,059	ns	ns	-	-

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados no omaso de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C14:1 <i>cis</i> -9	0,28	0,22	0,17	0,20	0,036	ns	ns	-	-
C15:0 <i>isso</i>	0,68	0,55	0,50	0,54	0,077	ns	ns	-	-
C15: <i>anteiso</i>	0,99	0,69	0,72	0,72	0,096	ns	ns	-	-
C16:1 <i>cis</i> -9	0,66	0,38	0,47	0,44	0,081	ns	ns	-	-
C17:1 <i>cis</i> -10	0,11	0,11	0,09	0,08	0,009	0,010	ns	$\hat{y} = 0,117 - 0,008*X$	0,72
C20:1 <i>cis</i> -11	0,15	0,02	0,07	0,05	0,053	ns	ns	-	-
C20:4 n-6	0,08	0,10	0,04	0,03	0,033	ns	ns	-	-
∑AG monoinsaturados par <i>cis</i>	14,81	13,20	12,66	11,22	2,046	ns	ns	-	-
∑AG monoinsaturados par <i>trans</i>	4,98	14,29	18,52	19,66	3,066	0,003	ns	$\hat{y} = 7,118 + 3,219*X$	0,76
∑AG monoinsaturados par total	19,78	27,50	31,18	30,88	4,508	0,050	ns	$\hat{y} = - *X$	-
∑AG monoinsaturado ímpar total	1,78	1,35	1,32	1,34	0,173	ns	ns	-	-
∑AG monoinsaturados total	21,56	28,85	32,50	32,21	4,388	ns	ns	-	-
∑AG poli-insaturados	4,42	4,73	4,06	3,63	0,440	ns	ns	-	-

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

O perfil de ácidos graxos no canal omasal é apresentado nas Tabelas 8, 9 e 10. O teor total de C18:1 assim como o perfil de C18:1 foi bastante alterado, principalmente com aumento dos ácidos graxos de cadeia *trans*. O teor de C18:1 passou de 18,69% no tratamento controle para 26,88; 30,48 e 30,10 nos tratamentos com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente. As vacas alimentadas com óleo de girassol apresentaram maiores teores de C18:1 *trans*-4, C18:1 *trans* 6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12, C18:1 *trans*-12 e *trans*-13, assim como maiores teores de C18:1 *cis*-13 e C18:1 *trans*-16 no canal do omaso. O efeito do óleo de girassol no aumento da concentração de C18:1 *trans*-11 no canal omasal pode ser um indicativo de que o OG inibiu o último passo no processo de biohidrogenação ruminal. De acordo com Looor et al., 2005, a redução de C18:1 para C18:0 é determinante no processo de biohidrogenação, e a inibição desse último passo é observada em dietas a base de óleo vegetal rico em ácido linolênico, como o óleo de girassol (Tabela 4) utilizado no presente trabalho.

Não houve efeito ($P>0,10$) nos teores de ácido esteárico no canal omasal, porém o mesmo aumentou no leite (Tabela 15). Já o teor de ácido vaccênico passou de 2,62% no tratamento controle para 7,18; 9,08 e 7,90% nos tratamentos com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente. Segundo Jenkins (1993), isto pode ser reflexo do elevado teor de ácido linoleico presente no óleo de girassol (Tabela 4).

Não houve efeito ($P>0,10$) no teor de CLA no omaso em função dos níveis de óleo de girassol. Resultados contrários foram encontrados por Looor et al. (2005) que encontraram valores maiores para CLA para as dietas com óleo de girassol quando comparadas com óleo de peixe, porém estão de acordo com os resultados de Shingfield et al. (2003) que também não encontraram diferenças nos teores de CLA em dietas suplementadas com óleo de peixe.

Tabela 11 - Parâmetros de degradação da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) da cana-de-açúcar no rúmen de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas suplementadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Variável ¹	Níveis de OG				EPM ²	Efeito (valor de P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
Degradabilidade da MS							
a (%)	42,4	41,8	39,8	42,0	1,0868	ns ³	ns
b (%)	25,5	26,7	26,7	26,1	1,6063	ns	ns
kd (%/h)	2,26	2,19	2,43	2,15	0,1873	ns	ns
DP (%)	67,9	68,5	66,5	68,2	0,8106	ns	ns
DE2 (%)	37,7	37,8	38,9	37,6	0,9764	ns	ns
DE5 (%)	24,9	25,3	25,8	24,5	0,8929	ns	ns
Degradabilidade da FDN							
B (%)	43,3	41,4	43,6	44,1	3,3034	ns	ns
I (%)	48,9	52,4	55,2	50,0	2,4699	ns	ns
kd (%/h)	2,36	2,44	3,14	2,78	0,4009	ns	ns
L (h)	3,9	1,6	4,2	4,6	1,0133	ns	ns
DE2 (%)	21,1	22,8	26,5	23,9	1,0096	ns	ns
DE5 (%)	12,5	13,6	16,8	14,7	1,0120	ns	ns

¹a = fração solúvel; b = fração insolúvel, potencialmente degradável; c = taxa de degradação da fração b; DP = degradabilidade potencial; DE2 e DE5 = degradabilidades efetivas calculadas utilizando, respectivamente, taxas de passagem no rúmen de 2 e 5%/h (ARC, 1984); B = fração potencialmente degradável; L = tempo de latência; I = fração indegradável; ²EPM = Erro-padrão da média; ³ns = não-significativo (P>0,05)

Não houve efeito (P>0,05) dos níveis de inclusão de óleo de girassol nas dietas sobre os parâmetros de degradação da matéria seca e da fibra em detergente neutro (Tabela 11), porém os valores encontrados no presente trabalho estão abaixo dos relatados por Valadares Filho et al. (2006). Uma provável explicação pode ser o tempo de incubação que foi máximo de 144 horas.

O tempo de incubação ruminal é uma das variáveis de maior influência sobre a representatividade dos resíduos indigestíveis em procedimentos de incubação *in situ*. Não existe na literatura consenso sobre o tempo de incubação ruminal que permita representar melhor a fração indigestível, principalmente de forrageiras tropicais. De acordo com

Berchielli et al. (2005), incubações em tempos inferiores a 144 horas podem não resultar em estimativas adequadas da fração total indigestível. Neste contexto, Huhtanen et al. (1994) também sugeriram que períodos de incubação inferiores a 288 horas podem não permitir boa aproximação à fração indegradável, assim como Casali et al. (2008) que sugeriram tempo de incubação superiores a 264 horas.

Não houve efeito ($P>0,05$) dos níveis de inclusão de óleo de girassol nas dietas sobre a produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura ou teores de proteína e lactose (Tabela 12). Porém, houve efeito linear decrescente dos níveis de óleo de girassol sobre os teores de gordura, sólidos no leite ($P<0,05$) e sobre a produção de gordura (Tabela 12).

Trabalhando com vacas Holandês x Gir, recebendo capim-elefante picado no cocho e suplementado com diferentes níveis de óleo de soja (0; 1,5; 3,0 e 4,5%) na MS das dietas, Ribeiro et al. (2007) também não observaram efeito dos tratamentos sobre o consumo de matéria seca e sobre a produção de leite corrigida ou não para 3,5% de gordura. Mas, da mesma forma que no presente trabalho, também relataram que houve redução linear na produção e no teor de gordura do leite ($P<0,05$) com a inclusão do óleo vegetal na dieta das vacas. Esses autores observaram, ainda, incremento linear no teor de proteína do leite ($P<0,05$). Uma provável explicação é o aumento do isômero CLA *trans-10 cis-12* observado na Tabela 16. A identificação do CLA *trans-10 cis-12* como responsável pela redução da secreção de gordura do leite (Baumgard et al., 2000), que pode ser explicada, em parte, pela inibição de enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase (Piperova et al., 2000), que são responsáveis pela *síntese de novo* de lipídeos na glândula mamária, determinando a formação dos ácidos graxos de cadeias curtas e médias (de 4 a 16 carbonos) secretados no leite.

Tabela 12 – Parâmetros da qualidade do leite para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)		
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q	
Produção de leite (kg/dia)	15,1	15,6	16,1	15,1	0,83	ns ²	ns	
Produção leite corrigida (kg/dia)	15,5	14,9	13,8	13,0	1,07	ns	ns	
Gordura (%)	3,68	3,25	2,66	2,64	0,16	<0,01	ns	
Produção gordura (kg/dia)	0,556	0,503	0,424	0,397	46,8	0,01	ns	
Proteína (%)	3,25	3,20	3,29	3,44	0,05	ns	ns	
Produção proteína (kg/dia)	0,490	0,498	0,526	0,521	23,5	ns	ns	
Lactose (%)	4,34	4,42	4,30	4,28	0,03	ns	ns	
Produção lactose (kg/dia)	0,653	0,687	0,690	0,646	37,6	ns	ns	
Sólidos totais (%)	12,16	11,76	11,10	11,21	0,18	<0,01	ns	
Produção sólidos totais (kg/dia)	1,83	1,82	1,77	1,69	109,7	ns	ns	
Extrato seco desengordurado (%)	8,48	8,51	8,44	8,56	0,04	ns	ns	
Produção ESD (kg/dia)	1,277	1,324	1,353	1,296	68,2	ns	ns	
Escore Linear para CCS	6,08	5,70	5,67	4,10	0,58	ns	ns	
Peso corporal médio (kg)*	467,1	466,0	473,5	466,7	0,28	-	-	
Variação peso corporal (kg/dia)*	0,86	0,88	0,78	0,31	0,32	-	-	
Equações de regressão							r ²	
Gordura (%)	$\hat{y} = 3,615 - 0,247 * X$						0,88	
Produção gordura (g/dia)	$\hat{y} = 553,677 - 37,090 * X$						0,69	
Sólidos totais (%)	$\hat{y} = 12,083 - 0,232 * X$						0,86	

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo (P>0,05); r² = coeficiente de determinação; *Não analisado estatisticamente

Por não apresentar distribuição normal, a contagem de células somáticas (CCS) foi transformada para a escala logarítmica em escore de células somáticas, conforme recomendado por Dabdoutb & Shook (1984): ECS = [log₂(CCS/100.000)] + 3). Não houve diferença (P>0,05) entre as dietas experimentais para escore de CCS (Tabela 12). A contagem de células somáticas (CCS) tem sido considerada medida padrão de qualidade, pois está relacionada à composição, rendimento industrial e segurança alimentar do leite. Devido à ação de lipases leucocitárias e lipoproteicas, a concentração de gordura no leite com elevada CCS tende a diminuir (Harmon, 1994). Neste contexto, a caseína do leite sofre expressiva redução, quando a CCS aumenta, devido à ação de proteases leucocitárias e sanguíneas. Por outro lado, ao mesmo tempo ocorre aumento das proteínas plasmáticas no leite em decorrência da resposta inflamatória.

O nitrogênio total (N) ingerido, o N fecal e o N urinário não sofreram alterações ($P>0,05$) com a inclusão do óleo de girassol nas dietas e estes foram bem próximos para todos os tratamentos (Tabela 13).

Tabela 13 – Médias de parâmetros da eficiência de utilização de nitrogênio para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Itens	Níveis de OG				EPM	Efeito (valor P)		
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q	
Nitrogênio ingerido (g)	296,44	312,87	318,74	287,34	14,6	ns ²	ns	
Nitrogênio fecal (g)	90,31	100,56	97,32	86,30	7,83	ns	ns	
Nitrogênio urinário (g)	118,92	120,83	116,94	113,44	2,83	ns	ns	
Nitrogênio no leite (g)	79,25	80,60	85,10	84,37	3,87	ns	ns	
Balanço N (g)	7,96	10,89	19,38	3,22	9,03	ns	ns	
Balanço N (% de N ingerido)	1,68	2,48	5,93	0,18	2,97	ns	ns	
Nitrogênio ureico urina (mg/kgPC)	134,8	106,62	97,36	109,88	2,58	ns	ns	
Nitrogênio ureico no leite (mg/dL)	12,17	13,08	10,74	11,14	1,15	ns	ns	
Nitrogênio ureico plasma (mg/dL)	10,76	14,14	11,78	10,45	1,40	ns	ns	
Purinas totais (mmol)	280,59	248,84	244,23	230,53	3,56	<0,001	ns	
Purinas absorvidas (mmol)	283,60	246,25	240,61	225,20	4,14	<0,001	ns	
N microbiano ruminal (g)	206,19	179,04	174,94	163,73	3,01	<0,001	ns	
Eficiência Mic (gPB/kg NDT)	123,11	97,86	91,55	83,04	4,33	<0,001	ns	
Equações de regressão							r ²	
Purinas totais (mmol)	$\hat{y} = 274,267 - 10,319 * X$						0,63	
Purinas absorvidas (mmol)	$\hat{y} = 276,044 - 12,057 * X$						0,77	
N microbiano ruminal (g)	$\hat{y} = 200,696 - 8,765 * X$						0,96	
Eficiência Mic (gPB/kg NDT)	$\hat{y} = 117,859 - 8,428 * X$						0,82	

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P>0,05$); r² = coeficiente de determinação

Houve efeito linear decrescente dos diferentes níveis de óleo de girassol sobre a excreção de derivados de purinas (Tabela 13). Essa redução refletiu em menor absorção intestinal de purinas, menor produção de proteína microbiana no rúmen e menor eficiência de síntese microbiana (Tabela 13). Esses efeitos podem ser decorrentes das reduções no crescimento de bactérias devido ao efeito ativo dos lipídeos na superfície das membranas dos micro-organismos, principalmente bactérias gram-positivas e protozoários, reduzindo suas atividades (Tamminga & Doreau, 1991), da pequena disponibilidade de cátions pela formação de complexos insolúveis com ácidos graxos de cadeia longa; e do recobrimento físico da fibra com lipídeos protegendo-a do ataque dos micro-organismos (Jenkins & McGuire, 2006).

As propriedades que determinam os efeitos antimicrobianos dos lipídeos incluem o grupo funcional, o grau de saturação e a associação física dos lipídeos às superfícies dos micro-organismos e das partículas dos alimentos. Pode-se inferir que a fonte de lipídeo utilizada nessa pesquisa seja responsável pela ausência de efeito na ingestão de MS, pois segundo Palmquist & Mattos (2006), esses ácidos graxos sofrem liberação lenta durante a fermentação ruminal o que possibilita a biohidrogenação quase completa.

Segundo Palmquist & Weiss (1994), os micro-organismos ruminais não são hábeis em utilizar lipídeos como fonte de energia para seu crescimento, afetando a síntese de proteína microbiana, e conseqüentemente, o fornecimento de aminoácidos para a síntese de proteína do leite. Porém não foi encontrada diferença significativa para percentagem, nem para a produção de proteína do leite em função das dietas experimentais.

Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) para a concentração de colesterol total e de HDL para as vacas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de óleo de girassol (Tabela 14). Esse aumento da concentração dos componentes lipídicos plasmáticos pode ser justificado em razão do maior consumo de ácidos graxos nas dietas experimentais, que proporcionou aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídeos transportados no sangue.

De acordo com Jenkins & Jenny (1989), níveis mais elevados de lipídeos no sangue são encontrados quando ocorre aumento da absorção no intestino de lipídeos da dieta ou pelo aumento da mobilização no tecido adiposo. De acordo com Salfer et al. (1995), a mobilização das reservas corporais pode ser caracterizada pelo aumento de ácidos graxos não esterificados, principalmente durante o período de transição em virtude da elevada demanda energética característica dessa fase. Durante a fase lactacional restante, o processo de mobilização é pouco significativo e os níveis de lipídeos circulantes são representados por triacilglicerídeos, fosfolipídeos e ésteres de colesterol, incorporados nas lipoproteínas, principalmente nas de baixa densidade (Clegg et al., 2001).

No presente trabalho, não foram encontradas diferenças no teor de AGNE e nem de triglicerídeos, para animais que se encontravam no terço médio da lactação em função das dietas experimentais. Isto também está de acordo com os resultados de Elliott et al. (1993). Estes autores encontraram aumento da concentração de colesterol total no sangue de vacas com 64 dias em lactação e suplementadas com diferentes fontes de gordura, com médias de

247 mg/dL e 246 mg/dL, respectivamente, para os níveis de 2,5 e 5,0% de EE na dieta. Os autores explicaram que esse aumento da concentração de colesterol total no sangue ocorre em razão da elevação da demanda necessária para digestão, absorção e transporte de ácidos graxos de cadeia longa ingeridos e que estavam presentes nas fontes de gordura.

A concentração de glicose plasmática não foi influenciada ($P>0,05$) pelas rações experimentais, sendo este resultado semelhante aos encontrados nos estudos de Elliott et al. (1993). Os níveis de glicose circulante em ruminantes são geralmente baixos e relativamente constantes, exceto no início da lactação, onde a demanda por nutrientes é alta e a falta de glicose pode levar o animal a desenvolver doenças metabólicas. Poucos trabalhos têm associado os níveis de glicose e a suplementação lipídica. Garnsworthy (2002) alertou que a disponibilidade de glicose tende a ser menor devido à substituição do amido por gordura na dieta, o que acarreta maior produção de propionato no rúmen, ou seja, o precursor de glicose no metabolismo de ruminantes.

Tabela 14 – Médias de parâmetros sanguíneos para vacas em lactação alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Variável	Níveis de OG				EPM ¹	Efeito (valor de P)		
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q	
Glicose (mg/dL)	52,52	52,91	58,46	56,26	1,63	ns ²	ns	
AGNE (mmol/L)	0,17	0,22	0,24	0,16	0,04	ns	ns	
Colesterol (mg/dL)	88,73	137,30	186,66	159,28	12,75	<0,01	0,03	
HDL (mg/dL)	47,76	80,13	74,21	60,53	10,14	ns	0,02	
Triglicerídeos (mg/dL)	3,27	3,43	3,86	4,44	0,97	ns	ns	
	Equações de regressão						r ²	
Colesterol (mg/dL)	$\hat{y} = 84,855 + 55,376*X - 8,439*X^2$						0,73	
HDL (mg/dL)	$\hat{y} = 49,289 + 25,184*X - 5,117*X^2$						0,85	

¹EPM = Erro-padrão da média; ²ns = não-significativo ($P>0,05$); r² = coeficiente de determinação

Houve diferença para o teor e quantidade diária de quase todas as classes de ácidos graxos (Tabela 15). As concentrações dos ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) na gordura do leite foram reduzidas ($P<0,05$) com a inclusão de óleo de girassol na dieta. Os resultados encontrados são benéficos, pois diversas pesquisas têm sido direcionadas no sentido de reduzir os teores de ácidos graxos saturados de cadeia média

com foco na redução do risco de doenças cardiovasculares (Dewhurst et al., 2006). Ainda neste contexto, de acordo com Baumgard et al. (2002), mudanças nos intermediários da biohidrogenação como o C18:1 *trans*-10 e o CLA *trans*-10, *cis*-12 podem inibir enzimas envolvidas na *síntese de novo* de ácidos graxos de cadeia curta e média na glândula mamária, como a acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintetase, o que foi observado no presente trabalho.

Os ácidos graxos da gordura do leite têm origem na *síntese de novo* nas células epiteliais do tecido mamário e na absorção de ácidos graxos de cadeia longa pré-formados. Ácidos graxos de cadeia curta e média são originados da *síntese de novo*, tendo como precursor o acetato e, em pequena parte, o β -hidroxibutirato. Já os ácidos graxos de cadeia longa são derivados dos lipídeos circulantes de origem dietética ou da mobilização das reservas corporais. Porém, segundo Chilliard et al. (2000), os ácidos graxos de 16 carbonos têm origem em ambos os processos. Bauman & Griinari (2003) demonstraram que os ácidos graxos de cadeia curta e média oriundos da *síntese de novo* decrescem linearmente, quando fontes lipídicas são fornecidas a vacas em lactação e, segundo os autores, essa inibição é devido a efeitos específicos sobre a glândula mamária mediados pelo incremento da ingestão de ácidos graxos de cadeia longa. Santos et al. (2001) encontraram reduções de 17,36% e 26,95% no teor de ácidos graxos de cadeia curta da gordura do leite de vacas suplementadas com grão de soja e óleo de soja, respectivamente. Eifert et al. (2006) também encontraram redução da participação de ácidos graxos de cadeia curta e média quando foi adicionado óleo de soja à dieta.

A inclusão de óleo de girassol na dieta promoveu aumento ($P < 0,05$) da concentração do ácido esteárico (18:0) na gordura do leite, que passou de 10,06% no tratamento controle para 12,59; 14,51 e 14,48% nos tratamentos com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 16). O aumento dos teores de ácido esteárico e oleico deve-se, provavelmente, ao elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa presentes no óleo de girassol (Tabela 4), que após passarem total ou parcialmente pela biohidrogenação no rúmen são incorporados à gordura do leite. Looor et al. (2005) explicaram que para a síntese de triglicerídeos da gordura do leite é requerido ácido oleico sintetizado pela Δ^9 dessaturase a partir do C18:0 derivado do plasma, sendo importante para a manutenção da fluidez do glóbulo de gordura dentro da célula mamária.

O ácido esteárico indica o grau de biohidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados no rúmen. A etapa inicial para biohidrogenação do ácido linoleico é uma reação de isomerização que converte a dupla ligação *cis*-12 no ácido graxo poli-insaturado para seu isômero *trans*-11. As etapas de redução subsequentes originarão o ácido *trans* vaccênico (C18:1 *trans*-11). A extensão na qual o ácido *trans* vaccênico é hidrogenado à C18:0 depende das condições do rúmen e a maior quantidade de ácidos linoleico parece inibir de forma irreversível esta reação (Jenkins, 1993).

No presente trabalho o teor de C18:1 *trans*-11 passou de 1,11% no tratamento controle para 2,98; 6,26 e 9,39% nas dietas com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 17), o que representa aumentos de 268, 564 e 846% quando comparados ao tratamento controle. Esse incremento refletiu no teor de CLA *cis*-9 *trans*-11 presente no leite, já que segundo Kay et al. (2004), a síntese endógena é responsável por grande parte, cerca de 64 a 93% de todo CLA *cis*-9 *trans*-11 presente no leite, sendo precursor o C18:1 *trans*-11 que escapa do processo de biohidrogenação ruminal. Esses resultados estão de acordo com Eifert et al. (2006) que encontraram o ácido vaccênico como o principal isômero encontrado no leite para o tratamento com inclusão de óleo de soja, sendo esse aumento de 230%. Outro ponto importante que deve ser levado em consideração é a bioconversão do ácido vaccênico (C18:1 *trans*-11) em CLA (C18:2 *cis*-9 *trans*-1). De acordo com Jutzeler van Wijlen & Colombani (2010), 20 a 25% do ácido vaccênico consumido é metabolizado em CLA no organismo humano, ou seja, beber leite enriquecido com ácido vaccênico é interessante do ponto de vista de saúde humana.

A inclusão de óleo de girassol à dieta aumentou a concentração de CLA (Tabela 17) na gordura do leite ($P < 0,05$). As dietas suplementadas propiciaram teor de CLA cinco vezes superior em relação ao tratamento controle, com médias de 0,52; 1,14; 2,41 e 2,67% para os tratamentos controle; e 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente. O CLA presente na gordura do leite é proveniente, em parte, da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico e parte é resultante da atividade da enzima Δ^9 dessaturase nas células da glândula mamária, que transformam o ácido vaccênico absorvido da corrente sanguínea em CLA (Bauman & Griinari, 2001). Dessa forma, espera-se que, quanto maior a concentração do 18:2n-6 na dieta, maiores as chances de elevar a concentração de CLA na gordura do leite. Este comportamento foi evidenciado neste estudo, pois o óleo de girassol é fonte de ácido

linoleico. Houve redução na concentração dos AG de cadeia ímpar, o que pode indicar efeito decrescente da inclusão de OG na dieta sobre a síntese bacteriana no rúmen (Vlaeminck et al., 2006).

Concomitantemente à redução verificada na concentração de ácidos graxos saturados, houve elevação ($P < 0,05$) de 57,0% na concentração de ácidos graxos insaturados na gordura do leite, que passou de 3,19% no tratamento controle para 3,80; 5,86 e 5,58% nos tratamentos com 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol, respectivamente (Tabela 17).

Foi observado incremento linear ($P < 0,001$) na concentração do CLA, sendo este aumento de, aproximadamente, 513% na dieta com maior inclusão de OG em relação ao controle. Segundo Kepler & Tover (1967), o ácido rumênico é o primeiro intermediário na biohidrogenação do ácido linoleico dietético, por meio da ação enzimática (*cis*-12,*trans*-11 octadecanodienoato isomerase) da bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. Este passo inicial requer, no entanto, previa lipólise dos galactolipídeos, fosfolipídeos e triglicerídeos da dieta, disponibilizando ácidos graxos não-esterificados com radicais carboxilas (-COO-) livres (Kepler et al., 1970). Assim, a etapa inicial de isomerização é seguida pela saturação da dupla ligação *cis*-9 por meio da ação da enzima *cis*-9, *trans*-11 linoleatoato redutase. E o produto desta redução é o ácido vaccênico (ácido C18:1 *trans*-11), o principal isômero *trans* do leite, manteiga e tecidos de ruminantes (Bessa et al., 2000).

Tabela 15 - Perfil de ácidos graxos saturados no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C4:0	3,96	3,55	3,47	2,26	0,364	<0,01	ns	$\hat{y} = 4,082 - 0,3448*X$	0,75
C6:0	2,06	1,78	1,5	0,87	0,236	<0,001	ns	$\hat{y} = 2,1295 - 0,2561*X$	0,75
C8:0	1,07	0,94	0,67	0,39	0,121	0,001	ns	$\hat{y} = 1,1147 - 0,1543*X$	0,81
C10:0	2,28	1,94	1,34	0,83	0,231	0,001	ns	$\hat{y} = 2,3432 - 0,3311*X$	0,84
C11:0	0,26	0,18	0,11	0,06	0,033	0,001	ns	$\hat{y} = 0,2542 - 0,0446*X$	0,81
C12:0	2,93	2,44	1,63	1,12	0,205	0,001	ns	$\hat{y} = 2,9657 - 0,4153*X$	0,91
C13:0	0,08	0,06	0,06	0,04	0,016	0,04	ns	$\hat{y} = 0,770 - 0,0086*X$	0,49
C14:0	11,46	10,11	7,85	6,07	0,475	<0,0001	ns	$\hat{y} = 11,6425 - 1,2301*X$	0,94
C15:0	1,42	1,2	1,09	0,93	0,058	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,3935 - 0,0160*X$	0,87
C16:0	35,35	29,87	21,68	20,14	2,372	<0,001	ns	$\hat{y} = 34,8345 - 3,5886*X$	0,85
C17:0	0,59	0,55	0,56	0,48	0,019	ns ³	ns	-	
C18:0	10,06	12,59	14,51	14,48	0,715	0,001	ns	$\hat{y} = 10,6320 + 1,0121*X$	0,89
C20:0	0,16	0,16	0,16	0,16	0,007	Ns	ns	-	
C21:0	0,05	0,05	0,07	0,1	0,023	Ns	ns	-	
C22:0	0,06	0,06	0,08	0,08	0,008	0,04	ns	$\hat{y} = 0,0567 + 0,0053*X$	0,60
C24:0	0,04	0,05	0,03	0,05	0,004	Ns	ns	-	
∑AG saturados total ímpar	2,39	2,03	1,88	1,6	0,11	<0,0001	ns	$\hat{y} = 2,3552 - 0,1681*X$	0,83
∑AG saturados cadeia curta total	9,36	8,21	6,98	4,35	0,913	0,001	ns	$\hat{y} = 9,6660 - 1,0851*X$	0,78
∑AG saturados cadeia média total	52,09	44,41	32,98	28,83	2,743	<0,0001	ns	$\hat{y} = 51,7617 - 5,4146*X$	0,89
∑AG saturados cadeia longa total	10,36	12,9	14,85	14,86	0,714	<0,01	ns	$\hat{y} = 10,9277 + 1,0293*X$	0,89
∑AG saturados total	71,82	65,53	54,81	48,04	2,626	<0,0001	ns	$\hat{y} = 72,3572 - 5,4710*X$	0,91

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

Tabela 16 - Perfil de ácidos graxos octadecenóicos *cis*, *trans* e conjugados no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C18:1 <i>trans</i> -4	0,02	0,03	0,04	0,06	0,005	0,001	ns	$\hat{y} = 0,0167 + 0,0086*X$	0,88
C18:1 <i>trans</i> -5	0,02	0,03	0,06	0,08	0,009	0,001	ns	$\hat{y} = 0,0135 + 0,0148*X$	0,89
C18:1 <i>trans</i> 6-8	0,1	0,34	0,44	0,76	0,071	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,0990 + 0,1376*X$	0,89
C18:1 <i>trans</i> -9	0,18	0,36	0,41	0,75	0,059	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,1635 + 0,1165*X$	0,90
C18:1 <i>trans</i> -10	0,34	1,16	1,06	3,78	0,745	0,01	ns	$\hat{y} = 0,0575 + 0,6791*X$	0,77
C18:1 <i>trans</i> -11	1,11	2,98	6,26	9,39	1,532	<0,001	ns	$\hat{y} = 0,7185 + 1,8748*X$	0,77
C18:1 <i>trans</i> -12	0,18	0,49	0,8	1,38	0,135	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,1232 + 0,2621*X$	0,89
C18:1 <i>trans</i> -13 e <i>trans</i> -14	0,27	0,59	0,78	1,29	0,079	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,2477 + 0,2151*X$	0,93
C18:1 <i>cis</i> -9 + C18:1 <i>trans</i> -15	16,38	18,8	21,05	20,32	0,791	0,04	ns	$\hat{y} = 17,0327 + 0,9360*X$	0,90
C18:1 <i>cis</i> -11	1,1	1,16	1,28	1,36	0,126	ns	ns	-	
C18:1 <i>cis</i> -12	0,27	0,52	0,67	0,82	0,102	<0,001	ns	$\hat{y} = 0,2982 + 0,1205*X$	0,76
C18:1 <i>cis</i> -13	0,05	0,07	0,24	0,22	0,082	ns	ns	-	
C18:1 <i>trans</i> -16	0,15	0,21	0,6	0,63	0,129	0,01	ns	$\hat{y} = 0,1240 + 0,1218*X$	0,78
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,07	0,14	0,16	0,16	0,019	0,02	ns	$\hat{y} = 0,0892 + 0,0203*X$	0,83
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	2,04	2,01	2,7	2,24	0,21	ns	ns	-	
Isômeros do C18:3 n-3	0,1	0,09	0,09	0,06	0,007	0,02	ns	-	
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,18	0,13	0,16	0,1	0,021	0,05	ns	$\hat{y} = 0,1707 - 0,012*X$	0,80
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,52	1,14	2,41	2,67	0,456	0,001	ns	$\hat{y} = 0,5250 + 0,5158*X$	0,68
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,04	0,05	0,09	0,11	0,013	0,001	ns	$\hat{y} = 0,033 + 0,0178*X$	0,82
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,02	0,05	0,06	0,12	0,012	<0,01	ns	$\hat{y} = 0,0180 + 0,0211*X$	0,91
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11+ <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,05	0,11	0,16	0,23	0,02	0,001	ns	$\hat{y} = 0,0495 + 0,0388*X$	0,76

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

Tabela 17 - Perfil de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Ácido graxo ^a (g/100g de AG totais)	Níveis de OG				EPM ^b	Efeito		Equações de regressão	r ²
	0,0	1,5	3	4,5		(valor de P)			
						L	Q		
C14:1 <i>cis</i> -9	0,78	0,62	0,47	0,32	0,099	0,01	ns	$\hat{y} = 0,7812 - 0,1033*X$	0,82
C15:0 iso	0,3	0,21	0,18	0,12	0,012	<0,0001	ns	$\hat{y} = 0,2845 - 0,0361*X$	0,91
C15:anteiso	0,6	0,45	0,52	0,35	0,038	<0,01	ns	$\hat{y} = 0,5777 - 0,0440*X$	0,79
C16:1 <i>cis</i> -9	1,33	0,95	0,75	0,75	0,156	0,01	ns	$\hat{y} = 1,2357 - 0,1286*X$	0,72
C17:1 <i>cis</i> -10	0,22	0,18	0,15	0,13	0,018	0,001	ns	$\hat{y} = 0,2205 - 0,0213*X$	0,79
C20:2 <i>cis</i> -11 <i>cis</i> -14	0,02	0,03	0,02	0,02	0,007	ns	ns	-	
C20:1 <i>cis</i> -11	0,06	0,05	0,07	0,08	0,008	0,04	ns	$\hat{y} = 0,0525 + 0,0050*X$	0,64
C20:3 n-6	0,07	0,05	0,06	0,04	0,007	0,03	ns	$\hat{y} = 0,0697 - 0,0060*X$	0,74
C20:4 n-6	0,13	0,08	0,1	0,06	0,015	<0,01	ns	$\hat{y} = 0,1242 - 0,0146*X$	0,71
∑AG monoinsaturados par <i>cis</i>	19,98	22,18	24,52	23,88	0,862	ns	ns	-	
∑AG monoinsaturados par <i>trans</i>	2,37	6,22	10,44	18,12	1,508	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,5677 + 3,4310*X$	0,91
∑AG monoinsaturados par total	22,36	28,4	34,96	42	2,139	<0,0001	ns	$\hat{y} = 22,1067 + 4,3653*X$	0,90
∑AG monoinsaturado ímpar total	1,11	0,85	0,86	0,6	0,057	<0,0001	ns	$\hat{y} = 1,0832 - 0,1020*X$	0,87
∑AG monoinsaturados total	23,47	29,24	35,81	42,6	2,103	<0,0001	ns	$\hat{y} = 23,1872 + 4,2640*X$	0,90
∑AG poli-insaturados	3,19	3,8	5,86	5,58	0,537	<0,01	ns	$\hat{y} = 3,2242 + 0,1848*X$	0,82

^aOs AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ^bEPM = Erro-padrão da média ^cns = não-significativo (P>0,10)

A atividade da enzima Δ^9 dessaturase na glândula mamária pode ser estudada indiretamente pela relação existente entre alguns ácidos graxos presentes no leite (14:1 *cis*-9/14:0; 16:1 *cis*-9/16:0; 18:1 *cis*-9/18:0, CLA/linoleico, CLA/vaccênico). Dentre essas relações, a que melhor afere esta atividade é a relação entre o ácido miristoleico e o mirístico (C14:1 *cis*-9/C14:0), devido ao fato de o C14:1 *cis*-9 apresentar teores elevados no leite, enquanto na digesta sua concentração é baixa ou elemento traço (Lock & Garnsworthy, 2003; Fievez et al., 2003). A avaliação da atividade dessa enzima é de suma importância em estudos que visam avaliar o teor de CLA na gordura do leite, sendo o par que apresenta a melhor indicação da atividade da enzima é o C14 já que o C14:0 é sintetizado na glândula mamária e o aparecimento de seu produto (C14:1 *cis*-9) na gordura do leite é quase que em sua totalidade resultado da atividade da Δ^9 dessaturase (Griinari et al., 2000).

Não houve diferença no índice de dessaturase entre as dietas para os pares C14, C16 e C18 (Tabela 18). Contudo, houve efeito para a delta CLA que foi linearmente decrescente entre os tratamentos. Os fatores que afetam a atividade da Δ^9 dessaturase não estão muito bem explicados, mas provavelmente são influenciados por fatores genéticos, estágio da lactação e nutrição dos animais (Lock & Garnsworthy, 2003). Griinari et al. (2000) confirmaram em seu trabalho a importância da Δ^9 dessaturase na produção do ácido oleico e observaram que a atividade desta enzima é a maior fonte dos ácidos miristoleico e palmitoleico encontrados na gordura do leite. Os mesmos autores comprovaram em seu estudo que a síntese endógena do CLA, via Δ^9 dessaturase, é a maior fonte deste isômero no leite de ruminantes.

Tabela 18 – Índice de dessaturase de vacas alimentadas com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Produto/substrato	Níveis de OG				EPM ^a	Efeito (valor de P)	
	0,0	1,5	3,0	4,5		L	Q
C _{14:1} /C _{14:0}	0,07	0,06	0,06	0,05	0,0085	ns ^b	ns
C _{16:1} /C _{16:0}	0,04	0,03	0,03	0,04	0,0043	ns	ns
C _{18:1} /C _{18:0}	1,74	1,51	1,52	1,43	0,1260	ns	ns
Delta CLA	0,44	0,37	0,38	0,28	0,0264	0,04	ns

^aEPM = Erro-padrão da média ^bns = não-significativo (P>0,05)

Fatores dietéticos e modificação do ambiente ruminal promovem diferenças significativas nos padrões de biohidrogenação, levando à formação de determinados intermediários em detrimento de outros. Neste contexto, as diversas rotas do processo de biohidrogenação estão associadas a enzimas específicas e espécies de bactérias que ainda não estão claramente compreendidos.

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) da inclusão de OG na dieta sobre o teor do CLA *trans*-10 *cis*-12, que é comprovadamente inibidor da síntese de gordura do leite (Tabela 19). Neste sentido, observou-se decréscimo ($P = 0,02$) de 0,0655 unidades percentuais no teor de gordura para cada 1% de incremento na concentração de CLA *trans*-10 *cis*-12. Este resultado pode apresentar implicações financeiras para o produtor de leite, haja vista que grande parte dos laticínios brasileiros possui programas de bonificação de pagamento por composição do leite, notadamente quanto aos teores de proteína e gordura.

Tabela 19 – Relações entre substratos e produtos da enzima Δ^9 dessaturase no leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Equações de regressão	r^2
$C14:1 \text{ cis-9} = -0,03020 + 0,06524*(C14:0)$	0,25
$C16:1 \text{ cis-9} = 0,29641 + 0,02428*(C16:0)$	0,22
$C18:1 \text{ cis-9 trans-11} = 0,27797 + 0,28513*(C18:1 \text{ trans-11})$	0,89
$\% \text{ de Gordura} = 3,48953 - 6,55473*(CLA \text{ trans-10 cis-12})$	0,29
$\% \text{ de Gordura} = 3,64201 - 7,96764*(CLA \text{ trans-9 cis-11})$	0,21
$\% \text{ de Gordura} = 3,66410 - 4,41812*(CLA \text{ trans-10 cis-12} + CLA \text{ trans-9 cis-11})$	0,33

Baumgard et al. (2002) infundiram 13,5 g/animal/dia de CLA e observaram 42% de redução na gordura do leite e 63% de redução na *síntese de novo*. Os autores avaliaram a expressão gênica mRNA de enzimas envolvidas na síntese lipídica: acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintetase, Δ^9 dessaturase, lípase lipoproteica, proteína ligada ao ácido graxo, glicerol-P aciltransferase e acilglicerol-P aciltransferase. Os autores encontraram 82% de diminuição da capacidade lipogênica, redução de 61% na oxidação do acetato a CO_2 e redução na expressão do mRNA das enzimas de 39 e 54%. Os autores concluíram que CLA *trans*-10, *cis*-12 inibe a síntese de gordura a partir de mecanismos que envolvem todo o processo de síntese, ou seja, o transporte e captura

dos ácidos graxos circulantes, a síntese *de novo*, a dessaturação e a formação dos triglicerídeos.

Tabela 20 - Efeito do tempo de amostragem sobre o pH e concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Hora	Parâmetros de fermentação ruminal ^{a, b}									
	pH	N-NH ₃	Acet	Prop	But	AGV	A:P	Acet%	Prop%	But%
0	6,60	7,74	36,27	10,11	5,93	52,31	3,66	69,72	19,28	11,01
2	6,26	19,29	37,92	14,04	7,41	59,36	2,98	64,82	23,07	12,11
4	5,98	20,26	39,37	16,93	9,48	65,79	2,55	60,95	25,01	14,04
6	6,04	17,13	38,77	17,13	9,95	65,85	2,32	58,93	25,86	15,21
8	5,90	15,09	41,88	17,94	11,38	71,21	2,36	58,79	25,17	16,04
10	5,81	12,51	42,32	18,08	12,45	72,84	2,36	58,05	24,83	17,13
12	5,96	11,07	42,89	16,38	11,28	70,56	2,64	60,71	23,19	16,10
18	6,05	9,01	43,24	15,15	10,58	68,97	2,90	62,78	21,86	15,36
24	6,70	8,71	36,41	10,09	5,94	52,44	3,72	69,94	19,05	11,00
EPM ^c	0,07	1,62	1,67	1,01	0,61	3,02	0,12	1,01	0,68	0,58

^aN-NH₃ = nitrogênio amoniacal (mg/100 mL); Acet, Prop e But, respectivamente, acetato, propionato e butirato (mMol/100 mL); AGV(ácidos graxos voláteis totais (mMol/100 mL); A:P = relação acetato:propionato; e Acet%, Prop% e But% = concentrações molares (%) de acetato, propionato e butirato, respectivamente; ^bMédias na mesma coluna seguidas de letras iguais são semelhantes (P>0,05); ^cEPM = Erro-padrão da média

Não houve interação entre tratamento e tempo e nem efeito de tratamento ($P>0,05$) para pH, concentração de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis no rúmen (Tabelas 20 e 21). Os resultados do presente trabalho corroboram com os encontrados por Ruy et al. (1996) e Chalupa et al. (1986), que não observaram modificações no pH com a adição de lipídeos.

Larson & Schultz (1970), trabalhando com vacas em lactação, também não encontraram efeito na proporção dos ácidos acético, propiônico e butírico, ao compararem dietas contendo ou não óleo de soja. Schauff et al. (1992), testando soja integral e/ou sebo bovino em dietas para vacas em lactação, observaram que a proporção molar de acetato e a relação acetato:propionato tenderam a decrescer nas dietas contendo lipídios. O pH, as proporções molares de butirato, isovalerato e a concentração de amônia não foram alterados pelos tratamentos, ainda de acordo com os autores supracitados.

Tabela 21 – Médias de parâmetros ruminiais de vacas Holandês x Gir alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com diferentes níveis de óleo de girassol (OG)

Parâmetro	Níveis de OG				EPM ^a
	0,0	1,5	3,0	4,5	
pH	6,16	6,06	6,18	6,17	0,046
Nitrogênio amoniacal, mg/100 mL	13,74	13,28	13,77	12,91	1,505
Acetato, $\mu\text{mol/mL}$	36,92	42,56	39,43	40,67	2,042
Propionato, $\mu\text{mol/mL}$	13,47	15,53	14,61	16,77	0,854
Butirato, $\mu\text{mol/mL}$	9,22	10,02	8,93	9,34	0,656
AGV totais, $\mu\text{mol/mL}$	59,62	68,11	62,97	66,78	3,198
Acetato, % molar	62,51	63,25	63,53	61,68	0,977
Propionato, % molar	22,32	22,39	22,77	24,66	0,538
Butirato, % molar	15,17	14,36	13,70	13,65	0,554
Relação Acetato:Propionato	2,90	2,92	2,90	2,60	0,091

^aEPM = Erro-padrão da média

A densidade média e o desvio padrão da média do número total de protozoários ciliados de cada gênero estão apresentados na Tabela 22. Nas dietas contendo 1,5% de óleo de girassol nenhum dos gêneros encontrados, com exceção de *Eremoplastron*, apresentou suas populações reduzidas em relação ao tratamento controle, sugerindo uma

possível resistência de grande parte dos ciliados a esta dieta. Tal resistência também foi observada nas populações de *Eudiplodinium* e *Ostracodinium* que reduziram apenas na dieta contendo 4,5% de óleo ($P < 0,01$). As densidades registradas para as três categorias de *Entodinium*, bem como para *Diplodinium* e o número total de ciliados foram significativamente menores na dieta contendo 3,0% de óleo em relação à dieta com 1,5%. Nota-se também que o gênero *Epidinium* sofreu defaunação completa nas dietas com 3,0% e 4,5% de óleo. Esses resultados reforçam a toxicidade de ácidos graxos insaturados sobre alguns protozoários ruminais. O efeito depressor da fonte lipídica também pode ser observado nas populações de *Eremoplastron*, cuja densidade média foi reduzida nas dietas contendo óleo de girassol. Estes dados corroboram com Váradyová et al. (2007), que relataram queda na densidade deste gênero em dietas contendo óleo de colza e girassol. Nota-se que a densidade média das espécies de tamanho médio do gênero *Entodinium* aumentou no tratamento com 4,5% de óleo de girassol, não diferindo do tratamento controle e, pressupondo-se uma possível adaptação deste gênero à dieta ao longo do período experimental.

A caracterização das espécies do gênero *Entodinium* conforme seu tamanho se faz importante, uma vez que está intimamente relacionada com a biomassa no rúmen, além de levar em consideração a diversidade funcional deste gênero. Deste modo, o conhecimento prévio da composição da microbiota favorece a flexibilização da dieta fornecida ao ruminante. O efeito do hospedeiro sobre a densidade média total das populações de ciliados mostrou-se tão importante quanto o da dieta, visto que a densidade média destes organismos variou significativamente conforme o animal em cada um dos tratamentos analisados. Tal observação somada aos altos desvios-padrão observados neste trabalho indica que, além dos fatores ligados à constituição da dieta, fatores metabólicos característicos dos animais também proporcionam variações nas populações de protozoários.

Doreau & Chilliard (1997) relataram o efeito defaunatório sobre os protozoários, quando gorduras insaturadas são adicionadas às dietas, principalmente fontes lipídicas ricas nos ácidos linoleico e linolênico. A consequência direta da defaunação é a queda na concentração de nitrogênio amoniacal decorrente da redução da atividade proteolítica dos protozoários, sendo que esse efeito não foi observado no presente estudo (Tabela 20). O decréscimo no número de protozoários, geralmente está associado a uma importante queda na reciclagem de N bacteriano no rúmen (Morais et al., 2006), isto é, ocorre o aumento no número de bactérias gram negativas e diminuição na concentração

de amônia (Jouany, 1996). Neste contexto, a suplementação lipídica na dieta de ruminantes tem sido explorada com estratégia promissora para aumentar a eficiência no sistema de produção animal e os benefícios ambientais decorrentes da redução da metanogênese devido à redução no número de protozoários e no decréscimo na formação de H₂ (Machmüller et al., 2000).

Tabela 22 - Densidade média (x10⁴) e desvio padrão da média (DP) de protozoários ciliados/mL de fluido ruminal (x10⁴) em vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar e óleo de girassol

Gêneros	Tratamentos								P
	0,0		1,5		3,0		4,5		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
<i>Charonina</i>	0,19	0,33	0,34	0,52	0,49	0,72	0,20	0,29	0,03
<i>Dasytricha</i>	5,47	4,76	4,52	3,26	5,51	6,87	3,10	2,94	0,10
<i>Diplodinium</i>	0,16 ^a	0,35	0,44 ^b	0,61	0,12 ^a	0,23	0,04 ^a	0,08	0,00
<i>Diploplastron</i>	0,12	0,26	0,07	0,15	0,10	0,22	0,02	0,08	0,17
<i>Entodinium P</i>	42,51 ^a	28,42	59,00 ^b	33,7	26,77 ^a	26,1	35,84 ^a	13,9	0,00
<i>Entodinium M</i>	13,34 ^a	8,14	15,68 ^a	8,01	7,80 ^b	2,88	14,56 ^a	7,67	0,00
<i>Entodinium G</i>	7,12 ^a	4,02	10,74 ^b	7,26	7,42 ^a	2,87	5,58 ^a	3,36	0,00
<i>Eodinium</i>	0,24	0,44	0,58	1,32	0,16	0,27	0,57	0,56	0,03
<i>Epidinium</i>	0,27	0,53	0,01	0,05	-	-	-	-	-
<i>Eremoplastron</i>	1,48 ^a	2,97	0,12 ^b	0,26	0,01 ^b	0,05	0,01 ^b	0,04	0,00
<i>Eudiplodinium</i>	0,25 ^a	0,30	0,15	0,21	0,11	0,27	0,02 ^b	0,08	0,00
<i>Isotricha</i>	1,88	3,24	1,55	1,37	1,40	1,85	1,34	2,65	0,77
<i>Ostracodinium</i>	0,20 ^a	0,23	0,15 ^a	0,18	0,14 ^a	0,20	0,03 ^b	0,06	0,00
<i>Polyplastron</i>	0,14	0,32	0,19	0,22	0,16	0,26	0,07	0,18	0,23
Total	73,4 ^a	36,72	93,61 ^a	49,3	50,23 ^b	34,40	61,43 ^b	21,4	0,00

^{a,b}Médias seguidas por letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas (P<0,01)
Fonte: Rossi et al. (2011)

CONCLUSÃO

A suplementação de óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar influencia positivamente o perfil de ácidos graxos no leite, diminuindo a quantidade de ácidos graxos de cadeia média como os ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) frequentemente relacionados a doenças cardiovasculares. A suplementação lipídica também proporciona aumento no teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente, o CLA, tornando o leite produzido ainda mais adequado ao consumo humano.

Redução no teor de gordura do leite pode ter implicação financeira para o produtor, considerando que parte dos laticínios brasileiros tem desenvolvido programas de bonificação de pagamento por composição do leite, notadamente quanto aos teores de proteína e gordura.

LITERATURA CITADA

- AGRICUTURAL RESEARCH COUNCIL. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Supplement N^o.1. **Commonwealth Agricultural Bureaux**, Farnham Royal, UK, pp. 38–39, 1994.
- AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; SHINGFIELD, K.J.; HUHTANEN, P. Determination of digesta flow entering the omasal canal of dairy cows using different marker systems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 90, p. 41–52, 2003.
- BATEMAN, H.G.; II; JENKINS, T.C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2451-2458, 1998.
- BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 23, p. 203–27, 2003.
- BAUMAN, D.E.; GRINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15-29, 2001.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.278, p.R179-R184, 2000.
- BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.2155-2163, 2002.
- BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; FEITOSA, W. et al. Estimativas da produção fecal e digestibilidade total em bovinos por meio de indicadores. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. (CD-ROM).
- BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J.M.R. et al. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science**, v.63, p.201-211, 2000.
- BRIEGER, F.O. **Início da safra. Como determinar a maturação.** Boletim Informativo Coperest, São Paulo, v.4, 1968. 1-3p.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.
- CHALUPA, W., B. VECCHIARELLI, A. E. ELSER, D. S. KRONFELD, D. SKLAN, and D. L. PALMQUIST. Ruminal fermentation *in vivo* as influenced by long-chain fatty acids. **Journal Dairy Science**. v.69, p.1293, 1986.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.

- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details (Occasional publication). **International Feed Resources Unit**. Bucksburn, Aberdeen:Rowett Research Institute. 21p. 1992.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.M.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnia**, v.49, p.181-205, 2000.
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; CAMPOS, J.M.S.; MARCONDES, M.I.; FONSECA, M.A. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1813-1821, 2006.
- CHRISTIE, W.W., J.L. CLAPPERTON, J.L. 1982. Structures of the triglycerides of cows' milk, fortified milks, including infant formulae and human milk. **Journal Society of Dairy Technology**. 35:22-24.
- CLEGG, R.A.; BARBERA, M.C.; POOLEYA, L. et al. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. **Livestock Production Science**, v.70, p.3-14, 2001.
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D. et al. Predicting digestibility diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1476-1483, 1986.
- COLUCCI, P.E. **Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle**. Guelph:University of Guelph, 1984, 221p. Thesis (Ph.D. Thesis Animal Science) - University of Guelph, 1984.
- CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J.K.G.; KENNELLY, J.J. et al. Evaluating the conjugated linoleic acid *trans* 18:1 isomers in milk fat dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.3786-3801, 2007.
- D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.3, p.725-729, 1999.
- DABDOUBT, S.A.M.; SHOOK, G.E. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count, and clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.163-4, 1984. Supplement 1.
- DEHORITY, B.A. Evaluation of sub sampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.1, p.182-185, 1984.
- DESTAILLATS, F.; GOLAY, P.A.; JOFFRE, F.; Wispelaere, M.; Hug, B.; Giuffrida, F.; Fauconnot, L.; Dionisi, F. 2007. Comparison of available analytical methods to measure *trans*-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. **Journal of Chromatography A**, v.1145, p.222-228.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 4, Aug. 2010 .
- DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F. et al. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science Technology**, v.131, p.168–206, 2006.
- DIAS, M.; DETMANN, E.; LEÃO, M.I. et al. Indicadores para estimativa da digestibilidade parcial em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.3, p.689-697, 2007.

- DOREAU, M., CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v.78, suppl 1, p.15-35, 1997.
- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LANNA, D.P.D. et al. Consumo, produção e composição do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e diferentes fontes de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.211-218, 2006.
- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LEÃO, M.I. et al. Efeito da Combinação de Óleo de Soja e Monensina na Dieta sobre o Consumo de Matéria Seca e a Digestão em Vacas Lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.297-308, 2005.
- ELLIOTT, J.P. et al. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.775-789, 1993.
- FIEVEZ V.; VLAEMINCK, B.; DHANOA, M. S. et al. Use of principal components analysis to investigate the origin of heptadecenoic acid and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p 1017-1053, 2003.
- FRANCE; J.; SIDDON, R.C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology**, v.121, n.2, p.105-119, 1986.
- FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E.R.; REEDS, P.J. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v.109, n.1, p.7-12, 1987.
- GARNSWORTHY, P.C. **Fat in dairy cow diets**. In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 4, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p, 2002.
- GRIINARI, M.; HISSA, K.; RYHANEN, E.L. Dietary sunflower oil increases conjugated linoleic acid concentration in beef. **Journal of Animal Science**. v. 78, n.1, p. 276, 2000.
- HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis**. (s.l.): Institute of Food Agricultural Sciences and University of Florida, 2000. 41p.
- HARA, A., and N.S. RADIN. 1978. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**. 90:420-426.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.
- HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.211-227, 1994.
- IDF – INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Whole milk. Determination of milk fat, protein and lactose content Guide for the operation of mid-infra-red instruments**. Bruxelas: 1996. 12p. (IDF Standard 141 B).
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- JENKINS, T.C.; JENNY, B.F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2316-2324, 1989.
- JENKINS, T.C.; MCGUIRE, M.A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1302-1310, 2006.
- JOHNSON, M.M.; PETERS, J.P. Technical Note: An improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.753-756, 1993.
- JOUANY, J. P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **Journal Nutrition**. v. 126, p. 1335S–1346S, 1996.

- JUTZELER VAN WIJLEN, R.P.; COLOMBANI, P.C. Grass-based ruminant production methods and 38 human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of 39 conjugated linoleic acids. **International Dairy Journal** 20(7): 433-448. 2010.
- KEPLER, C.R.; TOVE, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III.Purification and properties of a linoleate D12-*cis*, D11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.24, p.5686-5692, 1967.
- KEPLER, C.R.; TUCKER, W.P.; TOVE, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV.Substrate specificity and inhibition of linoleate D12-*cis*, D11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v.245, n.14,p.3612-3620, 1970.
- KRAMER, J.K.G.; V. FELLNER, M.E.R. Dugan, F.D. Sauer, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. **Lipids**, 32: 1219-1228.
- LARSON, S.A.; SCHULTZ, L.H. Effects of soybeans compared to soybeans oil and meal in the ration of dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.522-529, 2002 (suplemento) of Dairy Science, v.53, p.9, p.1233-1240, 1970.
- LEÃO, M.I. **Metodologias de coletas de digestas omasal e abomasal em novilhos submetidos a três níveis de ingestão: consumo, digestibilidade e produção microbiana**. 2002. 57p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LEITE, L.C. **Perfil dos ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe**. Piracicaba – ESALQ, (Tese de doutorado), 97p.,2006.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.
- LOCK, A. L., and P. C. GARNSWORTHY. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 -desaturase activity in dairy cows. **Livestock Production Science** 79:47–59.
- LOOR, J.J., DOREAU, M., CHARDIGNY, J.M., OLLIER, A., SEBEDIO, J.L., CHILLIARD, Y., 2005. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. **Animal Feed Science Technology**. 199, 227-246.
- LOOR, J.J., DOREAU, M., CHARDIGNY, J.M., OLLIER, A., SEBEDIO, J.L., CHILLIARD, Y., 2005. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. **Anim. Feed Sci. Tech.** 199, 227-246.
- LUCAS, H.L., 1957. Extra-period latin-square change-over designs. **Jounal of Dairy Science** 40, 225-239.
- MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; KREUZER, M. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v.85, p.41-56, 2000.
- MEHREZ, A. Z.; ORSKOV, E. R. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, n. 3, p. 645-650, 1977.

- MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1992. p.188-219.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240,2002.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G.C.; COLLINS, M.; MERTEN, D.R. et al. (Eds.). **Forage quality evaluation and utilization**. Madison: America Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society America, 1994. p.450-493.
- MERTENS, D.R., LOFTEN, J.R. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, 63:1437-1446.
- MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds) **Nutrição de Ruminantes**. 1ed., p.539-570, 2006.
- MYERS, W.D., LUDDEN, P.A., NAYIGIHUGU, V., HESS, B.W., 2004. Technical note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. **Journal of Animal Science** 82, 179-183.
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, 1997. p.524-632.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. Ed.National Academic Press. Washington, D.C.: 2001. 381p.
- OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of rumen microbiology**. 1ed. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, 1981.231p.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, n.2, p.499-503, 1979.
- PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLE, T.T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. Cap.10, p.287-309.
- PALMQUIST, D.L.; WEISS, W.P. Blood and hydrolyzed feather meals as source or undergradable protein in high fat diets for cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**. V.77, n.6, p.1630-1651, 1994.
- PIPEROVA, L. S., B. B. TETER, I. BRUCKENTAL, J. SAMPUGNA, S. E. MILLS, M. P. YURAWECZ, J. FRITSCHKE, K. KU, R. A. ERDMAN. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. **Journal of Nutrition**. 130, p.2568-2574, 2000.
- RIBEIRO, C. G.S.; GAMA, M.A.S.; LOPES, F.C.F. et al. Desempenho e composição do leite de vacas mestiças recebendo dietas baseadas em forragem tropical suplementadas com diferentes níveis de óleo de soja. In: REUNIÓN ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 20, 2007, Cuzco, **Anais...**Cuzco: ALPA, 2007. 1 Cd.
- ROACH, J.A.G. MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P.; KRAMER, J.K.G. 2002. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chemical Acta**, v.465, p.207-226.
- ROSSI, M.; MARTINELE, I.; SOUZA, S. M.; LOPES, F. C. F.; D'AGOSTO, M. Suplementação com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar e seus efeitos sobre as populações de protozoários ciliados no rúmen de vacas lactantes In:

- REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48, 2011, **Anais...** Belém (submetido).
- RUY, D.C.; LUCCI, C.S.; MELOTTI, L.; LIMA, M.L.M.. Degradação da proteína e fibra do caroço de algodão integral (*Gossypium hirsutum* L.) no rúmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 33, p.276-280, 1996.
- SALFER, J. A.; LINN, J.O.; OTTERBY, D.E.; et al. Early Lactation Responses of Holstein Cows Fed a Rumen-Inert Fat Prepartum, Postpartum, or Both. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.368-377, 1995.
- SANTOS, F.L.; LANA, R.P.; SILVA, M.T.C. et al. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia** 30(4):1376-1380, 2001.
- SAS INSTITUTE. SAS / STAT user's guide version 8.0. Cary, 2002. 291 p.
- SCHAUFF, D.J. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing soybeans and tallow. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1923-1935, 1992.
- SHINGFIELD, K. J., C. K. REYNOLDS, G. HERVAS, J. M. GRIINARI, A. S. GRANDISON, and D. E. BEEVER. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. **Journal of Dairy Science** 89:714–732.
- SHINGFIELD, K. J., S. AHVENJARVI, V. TOIVONEN, A. AROLA, K. V. V. NURMELA, P. HUHTANEN, and J. M. GRIINARI. 2003. Effect of fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science** 77:165–179.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 1.reimpressão. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- SILVA, M. M. C.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H.; RODRIGUES, C. A. F.; SARMENTO, J. L. R.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, S. P. Suplementação de lipídios em dietas para cabras em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 257-267, 2007.
- SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2463-2472, 1992.
- SNIFFEN, C.J., O'CONNOR J.D., VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- SUKHIJA, P. S., and D. L. PALMQUIST. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 36:1202–1206.
- TAMMINGA, S., and M. DOREAU. Lipids and rumen digestion. In: J. P. Jouany (Ed. **Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion**. p.151. INRA, Paris, France, 1991.
- UDÉN, P., P. E. COLUCCI, and P. J. VAN SOEST, 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of Science Food Agricultural** 31: 625-632.
- VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, P.V.R.;MAGALHÃES, K.A.; **Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas brasileiras de composição de alimentos**. 1 ed. Viçosa: Suprema Gráfica Ltda – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.D.F. Recentes avanços em proteína na nutrição de vacas leiteiras. In: II SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO. Lavras. **Anais...**,p. 229-247, 2001.

- VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.12, p.2686-2696, 1999.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. Ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VÁRADYOVÁ, Z.; KIŠIDAYOVÁ, S.; SIROKA, P.; JALČ, D. Fatty acid profiles of rumen fluid from sheep fed diets supplemented with various oils and effect on the rumen ciliate population. **Czech Journal of Animal Science**, v.52, n.11, p.399–406, 2007.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v.114, n.3, p.243-248, 1990.
- VLAEMINCK, B.V.; FIEVEZ, A.R.J.; CABRITA, A.J.M. et al. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.389-417, 2006.
- WALDO, D.R., 1986. Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. **Journal of Dairy Science** 69, 617-631.
- WEISS, W.P., 1999. Energy prediction equations for ruminant feeds. **Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**. Ithaca, New York. pp. 176-185.
- ZINN, R.A.; PLASCENCIA, A. Interaction of whole cottonseed and supplemental fat on digestive function in cattle. **Journal of Animal Science**, v.71, n.1, p.11-17, 1993.